

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Dipartimento di scienze della salute clinica di malattie infettive e
tropicali

Dottorato di ricerca in medicina clinica e sperimentale

XXIX Ciclo R 19



Effetto della gliadina sul bilancio ossidativo e danno al DNA nella linea cellulare Caco-2 e in pazienti celiaci

Tutor: Prof . Dario Conte, Luca Elli MD, PhD

Direttore della Scuola: Prof.ssa Antonella d'Arminio Monforte

Tesi di Dottorato di Ricerca:

Dott.ssa Erika Monguzzi

Matr. n. R10568

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	9
DISORDINI CORRELATI AL GLUTINE	9
IL FRUMENTO	10
CELIACHIA (CD)	15
NON CELIAC GLUTEN SENSITIVITY (NCGS)	19
ALLERGIA AL GRANO	21
MECCANISMI PATOGENETICI	23
STRESS OSSIDATIVO	27
<i>Perossidazione lipidica</i>	29
<i>Ossidazione delle proteine</i>	29
<i>Danni agli acidi nucleici</i>	29
<i>Sistemi antiossidanti</i>	30
<i>Ruolo fisiologico dei ROS</i>	32
<i>Stress ossidativo e infiammazione</i>	34
TRANSGLUTAMINASI 2	36
MODELLO CELLULARE	39
SCOPO DELLA RICERCA	42
MATERIALI E METODI	44
COLTURE CELLULARI	44
DIGESTIONE ENZIMATICA DELLA GLIADINA	44
TEST DI CITOTOSSICITA' (MTT TEST)	44
TEST DI VALUTAZIONE DI ROS	45
<i>Valutazione ROS tramite fluorimetro multiplastra</i>	45
<i>Dosaggio delle proteine</i>	46
VALUTAZIONE IMMUNOENZIMATICA	46
TEST DI GENOTOSSICITA'	47
<i>Comet test</i>	47
<i>Protocollo Comet test pH>13</i>	48
<i>Comet test pH modificato (pH=12) con enzima endonucleasi III</i>	50
WESTERN BLOT	51
FRAZIONAMENTO CELLULARE	54
ATTIVITA' DELLA TRASGLUTAMINASI 2	55
IMMUNOFLUORESCENZA γ -H2AX	55
<i>Procedura</i>	56
TEST PER LA VALUTAZIONE DELL' APOPTOSI	57
PAZIENTI	58
<i>Prelievo di biopsia per analisi immunoistochimica</i>	58

<i>Prelievo di siero per analisi stress ossidativo</i>	59
PREPARAZIONE DIE CAMPIONI DI SIERO	59
ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA.....	59
ANALISI STATISTICA	60
RISULTATI	61
CITOTOSSICITA'	61
VALUATAZIONE DELLA QUANTITA' DI ROS INTRACELLULARE	61
VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI CELIACI	62
COMET TEST ALCALINO (pH>13).....	63
COMET TEST pH MODIFICATO (pH=12).....	63
TEST DELL' ISTONE H2AX FOSFORILATO (γ -H2AX).....	64
ATTIVITA' DELLA TRANSGLUTAMINASI 2	64
<i>Elisa test</i>	64
<i>Western blot</i>	65
APOPTOSI.....	65
DANNO AL DNA IN VIVO	65
DISCUSSIONE	67
BIBLIOGRAFIA	75
GRAFICI	90

RIASSUNTO

Negli ultimi anni è stato osservato un notevole aumento delle patologie correlate all'ingestione di glutine (GRDs), verosimilmente associato a due fattori predominanti. Il primo fattore sarebbe legato alla diffusione di test sierologici per lo screening; Il secondo potrebbe essere correlato ad un aumento del consumo mondiale di grano negli ultimi. Infatti, i cereali che contengono glutine sono ampiamente consumati e le attuali varietà di grano hanno un più alto contenuto di glutine rispetto al passato a causa di cambiamenti e sviluppi tecnologici nella coltivazione e utilizzo di pesticidi.

In passato, la classificazione di GRDs era molto semplice, perché la celiachia (CD) e la Dermatite erpetiforme (DH) erano le uniche malattie conosciute con un ruolo ben definito del glutine nella loro patogenesi.

La crescente complessità nella nomenclatura e la presentazione clinica di GRDs hanno portato allo sviluppo di nuova classificazione in cui sono presenti: Celiachia (CD), non celiaci Gluten Sensitivity (NCGS), Allergia al grano (WA) Dermatite erpetiforme (DH), e atassia da glutine (GA), anche se si possono verificare una notevole sovrapposizione nella presentazione clinica.

Ogni disturbo glutine correlato esibisce una risposta fisiopatologica unica dopo l'ingestione di glutine.

Il glutine è il complesso proteico principale del grano con componenti proteiche che si trovano in altri cereali, tra cui segale e orzo. Le frazioni proteiche tossiche di glutine includono gliadine e glutenine, con gliadine contenenti proteine monomeriche e glutenine contenenti proteine polimeriche.

Nell'allergia al frumento (WA), e celiachia (CD) la reazione al glutine è mediata da linfociti T nella mucosa gastrointestinale. Tuttavia, nel WA è la reticolazione di immunoglobuline (Ig) E di sequenze ripetute in peptidi del glutine (per esempio, serina-glutammina-glutammina -glutamine- glutamine- prolina-prolina-fenilalanina) che innesca il rilascio di mediatori, quali istamina, in basofili e mastociti. La celiachia si caratterizza come un'inflammatione duodenale cronica in cui l'aumento della secrezione di citochine infiammatorie può a sua volta sconvolgere la permeabilità intestinale e produrre grandi quantità di specie reattive dell'ossigeno (ROS), alterando lo stato redox a livello cellulare.

Lo stress ossidativo è stato definito come lo squilibrio tra la produzione di ROS e le difese antiossidanti delle cellule a favore degli ossidanti, causando danni potenziali. I ROS sono prodotti durante i processi metabolici cellulari e se la produzione di ROS sommerge la capacità antiossidante (AO) di una cellula, si verifica una condizione nota come stress ossidativo.

La compromissione dell'equilibrio redox ha dimostrato di causare gravi danni in proteine, lipidi e il DNA. Negli ultimi dieci anni diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione al glutine riflette uno squilibrio ossidativo intracellulare, caratterizzato da: un aumento dei livelli di prodotti di perossidazione lipidica (4-idrossi-2 (E) -nonenal (4-HNE)), con un aumento del rapporto di glutathione (GSSG) ossidato / (GSH) ridotto e diminuzione del numero di gruppi sulfidrilici legati alle proteine

Infine, i ROS possono indurre la formazione di prodotti di DNA ossidativo con lesione di 8-idrossi guanosina (8-oxodG), che è considerato come un marcatore mutagenico. Il danno ossidativo può portare a rotture al singolo o doppio filamento, mutazioni frameshift e anomalie cromosomiche. Vi è una notevole prova circostanziale che il danno ossidativo al DNA può svolgere un ruolo importante non solo nella carcinogenesi, ma può essere utilizzato come marcatore predittivo di sviluppo del cancro e nell'invecchiamento. Oggigiorno, studi riguardanti il danno ossidativo sul DNA non sono stati sviluppati per quanto riguarda la celiachia.

Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare su una possibile correlazione tra stress ossidativo e danno genotossico indotta da gliadina sia *in vitro* che *in vivo*.

Come modello *in vitro* è stato utilizzato le cellule Caco-2, una linea cellulare epiteliale umana eterogenea colonrettale di adenocarcinoma generalmente utilizzate per questo tipo di studio. Invece come modello *in vivo* è stato utilizzato siero e biopsie duodenali di pazienti.

Per questo studio le cellule Caco-2 sono state esposte per 24h a concentrazioni crescenti (250µg / mL-1000µg / mL) di gliadina digerita (PT gliadina). Partendo da 500µg / mL (con un tempo di contatto di 12 ore), è stata osservato un aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS), valutata con una sonda fluorigenica (sonda DCFDA). Il comet test ha mostrato danni al DNA ad una concentrazione di 1000 µg/mL dopo 24h di trattamento, caratterizzata da un significativo aumento del %DNA nella coda. Inoltre, il comet test con enzima modificato ha mostrato danno ossidativo principalmente con endonucleasi-III,

calcolato come Δ tail moment dopo 24h di trattamento 24 ore alla concentrazione di 1000 μ g/mL.

Inoltre, l'immunoistochimica attraverso γ -H2AX (fosforilazione dell'istone H2AX a serina 139 per generare γ -H2AX in risposta a rotture del doppio filamento) ha dimostrato un aumento del numero di foci a 500 μ g/ml e 1000 μ g /ml come conferma di danno genotossico. L'attività della Transglutaminasi 2 (TG2) è stata valutata mediante Western Blot e il metodo ELISA. I risultati mostrano un aumento dell'espressione dell'enzima nella cromatina e citoscheletro a dosi differenti (250, 500, e 1000 μ g / mL) compatibili con l'apoptosi, come confermato dalla annessina V (metodo di colorazione citofluorimetrica). Infatti è stato osservato un aumento di cellule apoptotiche partendo da una dose di 250 μ g/mL.

Inoltre lo stress ossidativo è stato valutato attraverso l'analisi dei biomarcatori nel siero dei pazienti: pazienti celiaci prima diagnosi (NCD), pazienti celiaci, sottoposti a dieta priva di glutine da almeno 12 mesi (CD-GDF), celiaci refrattari, pazienti non responsivi alla dieta, sottoposti a dieta priva di glutine da almeno 12 mesi (RCD) e soggetti sani (CTRL).

I risultati hanno dimostrato che la Capacità Antiossidante Totale (TAC) sembra essere significativamente ridotta nei pazienti RCD rispetto ai CD-GDF ($p < 0.05$) e al CTRL ($p < 0.001$). Le concentrazioni plasmatiche di TBARS, valutati come marker della perossidazione lipidica e proteine carboniliche (PC), valutati come marker di ossidazione delle proteine, sono state trovate significativamente aumentate in RCD rispetto al CD-GDF, mentre i livelli plasmatici di CD-GDF sono risultati simili al CTRL in entrambi i biomarcatori plasmatici.

Per quanto riguarda il danno genotossico è stato confermato *in vivo* utilizzando biopsie duodenali di pazienti celiaci mediante immunoistochimica di γ -H2AX e 8-OHG.

In base ai risultati ottenuti possiamo concludere che la gliadina digerita induce un aumento della produzione di ROS nelle cellule Caco-2 con una alterazione dello stato redox cellulare. Inoltre, l'alta concentrazione di ROS induce danno al DNA e stimolazione del processo apoptotico. Questo meccanismo sembra presente anche *in vivo*, come dimostrano i risultati sui pazienti celiaci.

ABSTRACT

In recent years a significant increase of gluten-related disorders (GRDs) has been observed. Two factors seem at the basis of this increase. The first set would be related to the diffusion of serological tests. The second set of data associated with the increased prevalence of CD and GRDs could be related to an increase in the global consumption of wheat in recent decades; Cereals that contain gluten are widely consumed and current wheat varieties have a higher content in gluten compared to the past due to changes directed by both technology and nutritional reasons.

In the past, classification of GRDs was very simple, because CD and Dermatitis Herpetiformis (DH) were the only known diseases with a well-documented role of gluten in their pathogenesis.

Increasing complexity in the nomenclature and clinical presentation of GRDs has led to the development of a consensus document by a panel of experts on new classification including: CD, Non-Coeliac Gluten Sensitivity (NCGS), Wheat Allergy (WA) DH, and gluten ataxia (GA) although there can show considerable overlap in the clinical presentation.

Each gluten-related disorder exhibits a specific pathophysiological response to gluten ingestion. Gluten is the main structural protein complex of wheat with equivalent toxic proteins found in other cereals, including rye and barley. The toxic protein fractions of gluten include gliadins and glutenins, with gliadins containing monomeric proteins and glutenins containing aggregated proteins.

In wheat allergy (WA) and celiac disease (CD) the reaction to gluten is mediated by T-cell activation in the gastrointestinal mucosa. However, in WA it is the cross-linking of immunoglobulin (Ig)E by repeat sequences in gluten peptides (for example, serine-glutamine-glutamine -glutamine-(glutamine-) proline-proline-phenylalanine) that triggers the release of chemical mediators, such as histamine, from basophils and mast cells. Whereas in CD it is characterized as a chronic duodenal inflammation in which the increased secretion of inflammatory cytokines may in turn derange intestinal permeability and produce large amounts of reactive oxygen species (ROS), altering the redox state at the cellular level.

Oxidative stress has been defined as the imbalance between the production of ROS and the antioxidant defenses of the cells in favor of the oxidants, leading to potential damage. ROS are produced during the cellular metabolic processes; if the production of ROS overwhelms a cell's antioxidant (AO) capability, a condition known as oxidative stress occurs.

The impairment of redox equilibrium proved to cause severe damage in proteins, lipids and DNA. In the last decade several studies showed that gluten exposure reflects in an intracellular oxidative imbalance, characterized by: increased levels of lipid peroxidation products (4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE)), increased oxidized (GSSG)/reduced (GSH) glutathione ratio and decreased number of protein-bound sulfhydryl groups.

Finally, ROS can induce the formation of oxidative DNA lesion products (8-oxodG), which is considered as a mutagenicity marker. Oxidative damage can lead to single or double-strand breaks, point and frameshift mutations and chromosome abnormalities. There is considerable circumstantial evidence that oxidative DNA damage may play an important role not only in carcinogenesis, being used as a predictive marker of cancer development, but also in aging. Nowadays, studies concerning oxidative damage on DNA have not been developed with regard to CD.

The aim of this study was to investigate a possible gliadin-induced genotoxic damage and its correlation with oxidative stress *in vitro* and *in vivo*.

The *in vitro* models consist of Caco-2 cell line of heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells generally used for this type of study. Whereas the *in vivo* model has been used serum and duodenal biopsies of patients.

For this study the Caco-2 cells have been exposed for maximum 24h to increasing concentrations (250µg/mL–1000µg/mL) of digested gliadin (PT gliadin). Starting from a 500µg/mL dose (with a 12-hour contact time), an increase of reactive oxygen species (ROS) (DCFDA probe) was observed. The alkaline Comet assay showed DNA damage at a concentration of 1000 µg/mL after 24h, characterized by a significant increase of DNA in the tail. Furthermore, the enzyme-modified Comet assay showed oxidative damage mainly with endonuclease-III, calculated as Δ tail moment after 24h treatment at 1000µg/mL. Moreover, immunohistochemistry γ -H2AX detection (focal phosphorylation of histone H2AX at serine 139 to generate γ -H2AX in response to double-strand breaks) demonstrated an increase of the number of foci at 500µg/mL and 1000 µg/mL as genotoxic signature. The transglutaminase type 2 (TG2) activity was evaluated by western blot and ELISA method. The results show an increase of

the enzyme expression in the chromatin and cytoskeleton at different doses (250, 500, and 1000 µg/mL) compatible with apoptosis, as confirmed by annexin V (cytofluorometric staining method). Has been observed an increase of apoptotic cells starting from a 250 µg/ml dose.

The oxidative stress has been evaluated through the analysis of biomarkers into the serum of patients: naïve celiac disease (nCD), celiac patient responders, undergoing to gluten free diet at least 12 months (CD-GDF), refractory celiac patient non responders, undergoing to gluten free diet at least 12 months (RCD) and healthy subjects (CTRL). The results demonstrated that Total Antioxidant Capacity (TAC) appeared to be significantly decreased in patients RCD respect to CD-GDF ($p < 0.05$) and to CTRL ($p < 0.001$). Plasmatic concentrations of TBARS, assessed as marker of lipid peroxidation and protein carbonyls (PC), assessed as marker of protein oxidation, were found significantly increased in RCD respect to CD-GDF, while the plasma levels of CD-GDF resulted similar to CTRL in both plasma biomarkers.

Whereas the genotoxic damage was confirmed *in vivo* at the duodenal biopsy of celiac patients by means of H2AX e 8-OHG immunohistochemistry.

In conclusion digested gliadin induces an increase of ROS production in Caco-2 cells with an alteration of the cellular redox state. Moreover, the high concentration of ROS induces DNA damage and the stimulation of the apoptotic process. This mechanism seems present also *in vivo* as demonstrated by the findings from CD patients.

INTRODUZIONE

DISORDINI CORRELATI AL GLUTINE

Negli ultimi anni la prevalenza dei disordini correlati all'ingestione di glutine (GRDs) è notevolmente aumentata. Questo fenomeno potrebbe essere associato a diversi fattori.

Il primo motivo sarebbe legato al miglioramento delle metodiche diagnostiche, come la ricerca di nuovi biomarcatori nel sangue e analisi istologiche per la conferma della malattia. Mentre il secondo fattore potrebbe essere correlato a un aumento del consumo mondiale di frumento. Infatti, molti paesi stanno vivendo una progressiva occidentalizzazione, con un aumento della dieta mediterranea, che si basa su un ampio numero di alimenti che incorporano il glutine (compreso il frumento) (Volta U, 2013). In particolare, il consumo di grano sta progressivamente sostituendo il consumo di riso in molti paesi del Nord Africa, Medio Oriente, e Asia (Catassi C, 2007).

Inoltre ad oggi esistono nuove varianti di grano che si sono create come risultato della meccanizzazione sempre più marcata dell'agricoltura e del crescente utilizzo di pesticidi e fertilizzanti che potrebbero avere avuto un ruolo determinante nell'aumentata concentrazione di peptidi tossici nei "nuovi" cereali (gliadine, glutenine, inibitori dell'amilasi tripsina). Anche il processo di lievitazione del pane e dei prodotti da forno si è progressivamente ridotto con il risultato di un'aumentata concentrazione di peptidi tossici del glutine all'interno di tali alimenti (de Lorgeril M. 2014).

Tutti questi fattori hanno portato ad un aumento di disturbi clinici sia di tipo intestinale che extraintestinale (Elli L. 2015).

Nel 1980, la classificazione di GRDs era molto semplice perché nella celiachia (CD) e nella dermatite eritematosa (DE) il ruolo del glutine nella loro patogenesi era ben documentata. Con il passare del tempo e la crescente complessità dei sintomi ha portato allo sviluppo di una nuova classificazione. Infatti oggi i disordini glutine correlati comprendono 5 tipologie: celiachia (CD), sensibilità al glutine, allergia al grano, dermatite eritematosa e atassia al glutine (Figura 1). Ogni GRDs mostra una risposta fisiopatologica unica dopo l'ingestione di glutine anche se ci possono essere delle sovrapposizioni nella presentazione clinica (Tovoli F. 2015; Sapone A. 2012).

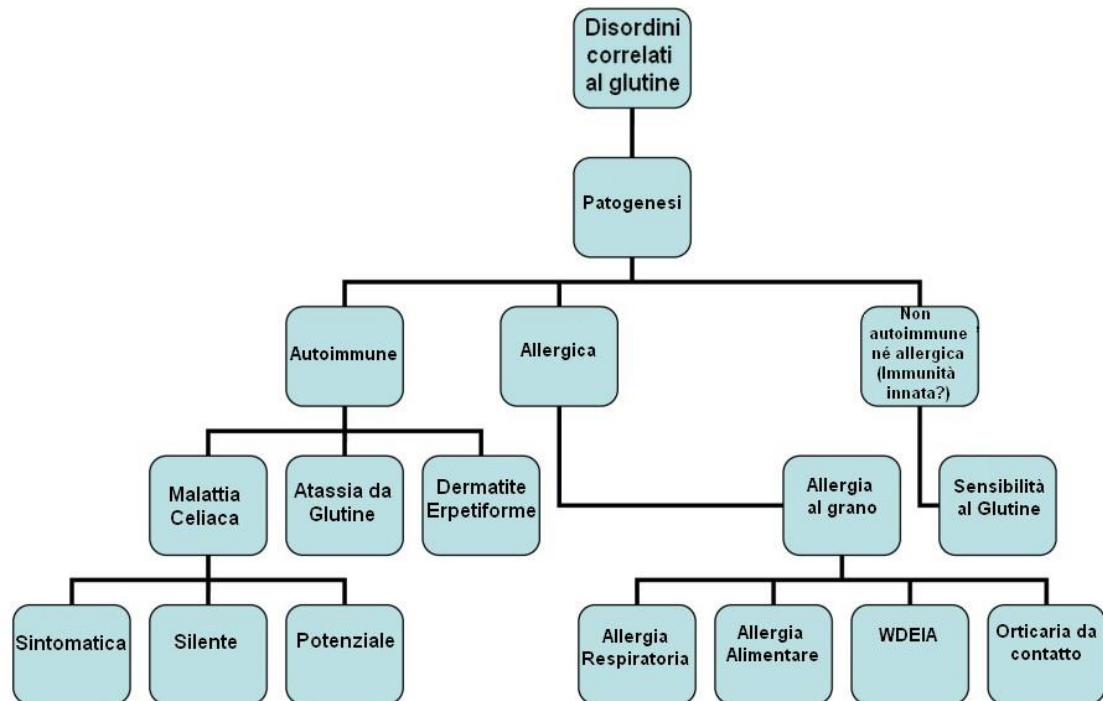


Figura 1 Nuova nomenclatura e classificazione di disordini correlati al glutine (Sapone A. 2012)

L'aumento della prevalenza e la complessità delle GRDs hanno inevitabilmente suscitato un crescente interesse delle diete senza glutine (GFD), portando a un aumento della produzione di cibi senza glutine da parte delle industrie alimentari. Sebbene un GFD rappresenti il trattamento raccomandato nelle GRDs, molte persone si imbattono in questo tipo di dieta solo perché sono convinti di seguire un regime alimentare più sano (Tovoli F. 2015).

IL FRUMENTO

Il frumento è attualmente la specie più largamente coltivata, in un'area che va dalla Scandinavia all'Argentina, comprendendo anche zone ad una elevata altitudine nelle regioni tropicali e subtropicali. Inoltre, è il prodotto primario più consumato al mondo, di cui circa il 65% è utilizzato per l'alimentazione umana, il 21% per quella animale, l'8% come semente e il restante 6% per altri usi compreso quello industriale (Orth R.A. 1988). L'estesa coltivazione del frumento su scala mondiale trova spiegazione nel buon profilo nutrizionale, nella facilità di conservazione e trasporto delle relative cariossidi e nella

grande versatilità degli impasti ottenuti mescolando la farina o la semola di frumento ad acqua (Cianferoni A. 2016). Per quanto concerne il profilo nutrizionale, la cariosside di frumento è un'ottima fonte di carboidrati, essendo costituita per l'80% da amido, e inoltre presenta un discreto contenuto di fibre, proteine, vitamine e minerali. Il contenuto proteico della cariosside di grano è compreso fra il 10% e il 18% del peso secco ma, come gran parte delle proteine di origine vegetale, esse sono carenti di alcuni amminoacidi essenziali, quali la lisina ed il triptofano. Tali amminoacidi devono essere integrati nella dieta dall'assunzione di proteine in cui questi amminoacidi sono abbondanti, presenti nella carne, nel pesce, nei formaggi e nelle uova. Dal punto di vista fisiologico le proteine di frumento sono per la maggior parte proteine di riserva che vengono accumulate nell'endosperma in maturazione e rappresentano una fonte energetica di carbonio ed azoto per l'embrione nelle fasi precoci di germinazione (Shewry 1995).

Tassonomicamente il frumento appartiene al genere *Triticum*, sottotribù *Triticinae*, tribù *Triticeae*, famiglia *Graminaceae*. Il frumento coltivato consiste di varie specie, a diverso livello di ploidia (diploidi, tetraploidi, esaploidi, con numero di base $x = 7$) che hanno avuto origine da specie selvatiche attraverso il fenomeno dell'aneuploidia, un processo in cui poliploidi fertili si sono formati in seguito ad incroci spontanei tra specie selvatiche diploidi e poliploidi aventi un diverso assetto cromosomico (ibridazione), seguiti dal raddoppiamento spontaneo dei cromosomi (Konarev V.G. 1983).

I frumenti attualmente coltivati appartengono in larga parte a specie tetraploidi ed esaploidi rappresentate rispettivamente da frumenti duri (*T. durum*, AABB) e teneri (*T. aestivum*, AABBDD). Il frumento duro è coltivato, nell'ambito comunitario, solo nei paesi mediterranei (Italia, Francia, Grecia, stati iberici), mentre nel resto del mondo viene coltivato quasi esclusivamente negli Stati Uniti, in Australia ed in alcune zone della Russia, in quanto necessita di particolari condizioni di crescita caratterizzate da climi caldi e secchi. Il frumento duro è utilizzato prevalentemente per la produzione di pasta (di cui l'Italia è il primo produttore mondiale) e di pane, specialmente in alcune regioni dell'Italia meridionale.

Il frumento tenero, invece, presenta una coltivazione più largamente diffusa su scala mondiale, rappresentando il 95% della produzione totale di frumento (Dick J.W. 1988). La grande espansione della coltivazione di frumento tenero rispetto al frumento duro, è in relazione alla sua maggiore adattabilità a diverse condizioni idro-climatiche e alle sue ottime caratteristiche panificatorie che sono state da ultimo correlate alla presenza del

genoma D. La maggiore adattabilità a diverse condizioni climatiche trova invece spiegazione nella natura esaploide di questa specie di Triticum.

Il frumento contiene una quantità di proteine variabile dal 7 al 18%, a seconda delle tipologie, mediamente ne contiene il 12% e rappresentano la maggior causa di malattia allergiche.

Un primo studio sistematico delle proteine del frumento risalente al 1907 proponeva un sistema di classificazione delle proteine di riserva in base alla loro solubilità e ha portato all'individuazione di quattro classi:

- albumine: solubili in acqua
- globuline: solubili in soluzioni saline
- gliadine: solubili in etanolo 70-90%
- glutenine: solubili in acidi o alcali diluiti

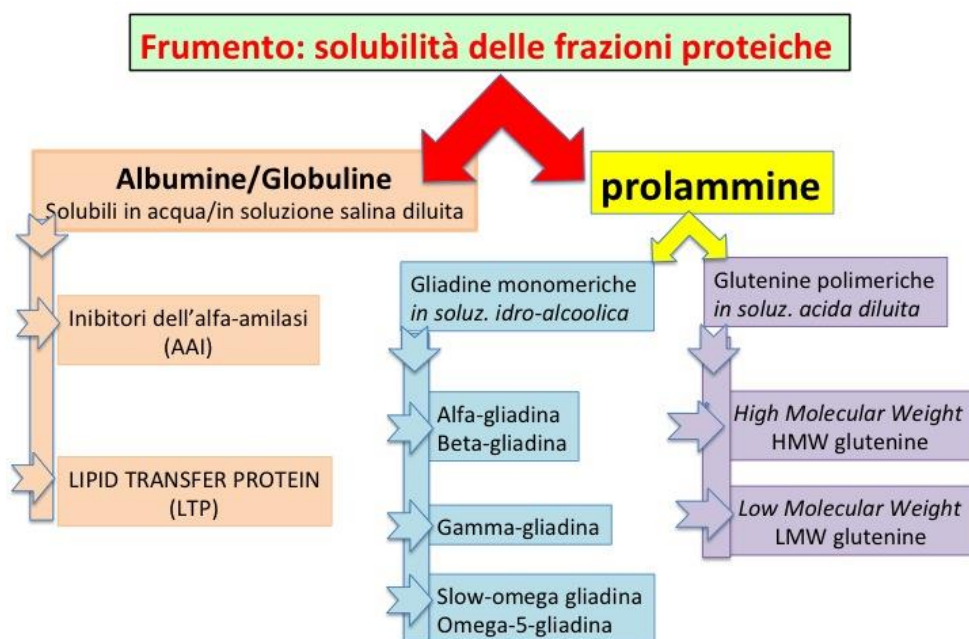


Figura 2 Classificazione delle proteine del frumento

Le albumine (9% del contenuto proteico totale) sono ricche in glutamina, leucina, lisina e prolina. Si trovano nella parte esterna della cariosside e nell'embrione; le globuline (5-7% del contenuto proteico totale) si trovano nel germe, e sono ricche di lisina, arginina, serina e cisteine. Entrambe sono proteine complete in aminoacidi essenziali ma vengono

allontanate con la macinazione essendo presenti solo nel germe e nel pericarpo. All'interno di questo gruppo sottolineiamo:

- **gli inibitori dell'alfa-amilasi. (AAI alfa-amilasi inibitori):** che rappresentano una strategia di difesa verso i predatori basata sulla produzione di molecole di natura proteica e non, in grado di inibire l'attività degli enzimi secreti dall'apparato digerente degli insetti e degli animali superiori tra cui anche dell'uomo. Gli inibitori proteici dell'alfa-amilasi esogena dei cereali vengono generalmente classificati a seconda della loro struttura quaternaria in: monomerici, dimerici e tetramerici. Sono proteine composte da 120-160 aminoacidi per ogni subunità, e ognuna di queste è molto simile per struttura e peso molecolare. In particolare, ogni subunità ha un peso di circa 12-15 kDa ed ha cinque ponti disolfuro che ne stabilizzano la struttura secondaria.

Gli inibitori monomerici sono stati ampiamente studiati. La prima proteina ad essere stata isolata è stata nominata WMAI-1. Successivamente sono state isolate altre proteine che hanno caratteristiche simili. Due di queste isoforme, indicate come WRP25 e WRP26, differiscono in sequenza l'una dall'altra soltanto per due residui amminoacidici e sono caratterizzati da un'altissima omologia con l'inibitore WMAI-1. Un'altra isoforma, WRP27, possiede una sequenza distinta da quelle delle ultime menzionate.

Gli inibitori dimerici sono identificati con la sigla WDAI (Wheat Dimeric Amylase Inhibitors). Tra gli omodimeri accertati ci sono tre isoforme: WDAI-1, WDAI-2 (0.19) e WDAI-3.

Gli inibitori tetramerici vengono spesso identificati con la sigla WTAI (Wheat Tetrameric Amylase Inhibitors), ma sono anche noti con il nome di "CM-proteins" in quanto solubili in miscele di cloroformio e metanolo, utilizzati per l'estrazione dalle farine. Attualmente sono conosciute sette subunità denominate CM1, CM2, CM3A, CM3B, CM3D, CM16. Di quest'ultima isoforma di 16 kDa esiste una variante omologa glicosilata. Questa N-glicosilazione sembrerebbe implicata nel rendere questo peptide uno degli allergeni inalatori più potenti delle farine di frumento, riconosciuta dalla maggior parte delle IgE dei soggetti affetti da asma del panificatore (Quirce S. 2013).

- **Le Lipid Transfer Protein (LTP)**, originariamente così denominate per la loro capacità di trasferire fosfolipidi tra vescicole e membrane, possono suddividersi in due tipi: quelle specifiche per determinate classi di fosfolipidi, e quelle che sono in grado di veicolare varie classi di lipidi, chiamate nonspecific LTPs (nsLTPs). A seconda del loro

peso molecolare vengono classificate 2 sottofamiglie, la nsLTP1 con 9 kDa e la nsLTP2 con 7 kDa. (Yeats T.H. 2008).

La restante quota di proteine (75-95%) è data dalle gliadine e dalle glutenine che appartengono alla famiglia delle prolamine o prolammine. Il nome “prolamina” deriva dal loro eccezionale contenuto in 2 aminoacidi: la prolina e la glutamina.

Gliadine e glutenine sono le principali frazioni proteiche del glutine e sono responsabili delle caratteristiche tecnologiche e nutrizionali dei prodotti a base di farina di frumento; in quanto conferisce elasticità e viscosità all'impasto proprio per le sue caratteristiche chimico-fisiche. Le glutenine formano un complesso reticolo nelle cui maglie vengono intrappolate le gliadine che a loro volta trattengono le molecole d'acqua rendendo l'impasto nello stesso tempo soffice ed elastico (Figura 3) (Koning F. 2015).

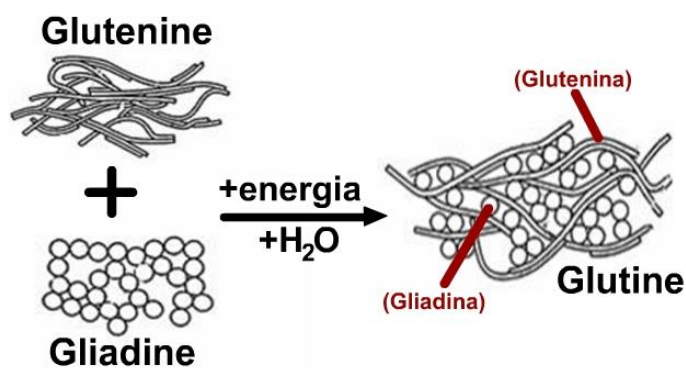


Figura 3 Composizione del glutine

Le gliadine rappresentano la frazione alcol-solubile del glutine, sono costituite da singole catene polipeptidiche, di peso molecolare compreso tra i 30 e i 75 kDa, e sono caratterizzate dalla presenza di sequenze ripetute costituite da 32-56 residui di glutamina e 15-30 residui di prolina ogni 100 residui amminoacidici.

Sono proteine monomeriche caratterizzate da alcune differenze nell'organizzazione strutturale. Possiedono regioni di microeterogenicità in base alle quali possono essere distinte in quattro frazioni: alfa-gliadina, beta-gliadina, gamma-gliadina e omega-gliadine. (Koning F. 2015).

Le gliadine rappresentano la principale componente proteica e sono le responsabili dell'innesco della risposta infiammatoria verso il glutine nella malattia celiaca. Infatti, la

componente tossica è stata identificata in un peptide di 33 amminoacidi dell'alfa-gliadina (corrispondente alla regione 56-88 dell' α -gliadina).

Gli epitopi antigenici del glutine sono localizzati nelle regioni ricche di residui di prolina resistenti alla proteolisi dei succhi gastrici e del succo pancreatico. Ciò determina, un accumulo di questi peptidi "tossici" nel lume intestinale (cioè rimangono intatti per tutto il processo digestivo e agiscono anche come potenziale antigene per la proliferazione dei linfociti T). Inoltre tali epitopi sono il substrato principale della transglutaminasi 2 (TG2) (de Lorgeril M. 2014).

Le glutenine, frazione insolubile, sono proteine polimeriche con un peso molecolare che può variare da 60KDa fino a milioni di Da, costituendo i polimeri di maggiori dimensioni presenti in natura. Sono proteine polimeriche costituite da subunità: un 20% di subunità ad elevato peso molecolare (HMW), che sono relativamente povere di zolfo e il restante 80% delle subunità a basso peso molecolare (LMW) (Shewry P.R. 2002).

CELIACHIA (CD)

In passato, la celiachia (CD) è stata considerata una malattia rara, colpisce soprattutto individui di origine europea, di solito caratterizzata da esordio nei primi anni di vita. In quel momento, la diagnosi era interamente basata sul rilevamento di sintomi tipici gastrointestinali e la conferma da biopsia del piccolo intestino. L'emergere di strumenti sierologiche altamente sensibili e specifici, prima l'antigliadina e più tardi l'antiendomio e gli anticorpi anti-transglutaminasi, ha mostrato una frequenza insospettata di forme clinicamente atipici o addirittura silenziosi di CD. Utilizzando questi strumenti sierologici sensibili, un gran numero di studi hanno dimostrato che CD è uno dei più comuni, disturbi permanente che interessano l'umanità in tutto il mondo (Catassi C. 2015).

Un ampio studio multicentrico internazionale ha pubblicato recentemente i risultati su un campione di popolazione in quattro diversi paesi europei: in media, la prevalenza complessiva del CD è stata dell'1%, con notevoli variazioni tra i vari paesi (2,0% in Finlandia, 1,2% in Italia, 0,9% in Irlanda del Nord, e dello 0,3% in Germania) (Mustalahti K. 2010). Per quanto riguarda gli Usa, nel 1975 solo lo 0,2% della popolazione era diagnosticata come celiaca, mentre nel nuovo millennio la quantità è quintuplicata (1:133) (Fasano A. 2003). L'epidemiologia della celiachia è stata studiata anche in paesi popolati da individui di origine europea e in cui si consuma molto frumento, come il Nord Africa e

il Medio Oriente: in queste zone si assiste a un'analogia con la realtà europea e americana, nonostante il tasso di diagnosi sia estremamente basso a causa sia della scarsa disponibilità di servizi diagnostici che di una bassa consapevolezza della malattia. Nel continente asiatico, infine, la presenza della celiachia è ancora per lo più limitata alla cosiddetta "cintura celiaca", l'area settentrionale dell'India, dovuta in parte alla diversa distribuzione della coltivazione del grano e del riso tra nord e sud. Tra i 5 e gli 8 milioni è il numero di celiaci stimato (popolazione adulta e pediatrica). si presume per la diversa distribuzione della coltivazione del grano e del riso tra nord e sud. Le stime parlano di 5-8 milioni di persone che dovrebbero essere affette da questa malattia in India. Infine, in paesi come Giappone, Indonesia, Corea, Filippine e molte piccole isole del Pacifico questo disturbo dovrebbe essere raro, visto il basso consumo di frumento e la bassa frequenza di genotipi predisponenti (Figura 3) (Catassi C. 2015).



Figura 4 Prevalenza della celiachia nel mondo

La celiachia è un'enteropatia immuno-mediata caratterizzata da atrofia dei villi intestinali, ipertrofia delle cripte e infiltrazione della mucosa da parte di cellule infiammatorie, causata, in individui geneticamente predisposti (aplotipo HLA DQ2/HLA DQ8), dall'ingestione di glutine.

I geni implicati nell'insorgenza della celiachia sono situati sul braccio corto del cromosoma 6 e codificano per il complesso maggiore di istocompatibilità, HLA (Human

Leukocyte Antigen) il quale risulta di particolare importanza per il corretto controllo della risposta immunitaria. Le molecole HLA sono esposte sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC), legano i peptidi antigenici derivati dal glutine e riconosciuti dal recettore (TCR) posto sulla superficie dei linfociti T CD4⁺ (Stamnaes J. 2015).

L'eterodimero DQ2 è presente nel 95% dei soggetti celiaci. Il rischio di ammalarsi di celiachia per i soggetti portatori di questo gene è di uno su cento. Mentre il rischio di ammalarsi di celiachia nei soggetti che presentano il DQ8 ma non il DQ2 è di uno su duemila cento (Sollid L.M. 2005).

In particolare, i geni DQ2 e DQ8 determinerebbero, rispettivamente, la sostituzione di un acido aspartico in posizione 57 della catena beta e la presenza di una serina in posizione 75 della catena alfa degli eterodimeri codificati, tali da alterare il legame con l'antigene. Questo comporterebbe una non corretta presentazione dei peptidi della gliadina al TCR dei linfociti T scatenando una alterata risposta immunologica nei suoi confronti (Stamnaes J. 2015).

Da quanto descritto risulta che i geni HLA sono essenziali per l'intolleranza, ma non spiegano il completo meccanismo della risposta immunitaria. Senza questi geni specifici non si sviluppa la celiachia, e chi possiede i geni ma non produce anticorpi antigliadina (AGA) e anti-endomisio (EMA) non è escluso dalla possibilità di sviluppare l'intolleranza in futuro.

Tuttavia il 25-30% della popolazione normale ha l'aplotipo HLA-DQ2, ma solo l'1% dei soggetti con questa predisposizione genetica sviluppa la CD, indicando il coinvolgimento di altri geni, probabilmente non HLA-associati (ad esempio CTLA-4), nella patogenesi di questa malattia (Dieterich W. 1998, Koning F. 2005, Schuppan D. 2000).

La presenza degli alleli che codificano il DQ2 ed il DQ8 è quindi condizione necessaria ma non sufficiente allo sviluppo della malattia.

La celiachia è caratterizzata da una gamma estremamente ampia di possibili presentazioni cliniche. Si riconosce una cosiddetta forma classica, caratterizzata da sintomi tipici di malassorbimento, quali diarrea, steatorrea e/o calo ponderale; una forma subclinica, caratterizzata da sintomi minori anche extraintestinali e infine la forma silente caratterizzata dall'assenza di sintomi e segni riferibili al malassorbimento. Attualmente la celiachia tende a manifestarsi sempre più spesso nella forma ad esordio tardivo presentandosi con disturbi intestinali sia tipici che atipici (dolori addominali ricorrenti, stipsi, meteorismi), e soprattutto con manifestazioni extraintestinali (anemia, dermatite

erpetiforme, stomatite aftosa, bassa statura, artriti ecc.) (Melissa R. 2016, Di Sabatino A. 2009).

In seguito all'ingestione di glutine la mucosa intestinale va incontro ad alterazioni istologiche e la principale metodica di diagnosi prevede l'analisi di biopsie intestinali (Dewar D.H. 2005).

La mucosa intestinale normale è costituita da un sottile strato di tessuto muscolare (*muscularis mucosae*) ricoperto dalla lamina basale; verso la parte luminale sono presenti i villi intestinali, mentre verso la parte basale rimangono delle cripte o avvallamenti. In condizioni normali il rapporto villi: cripte è maggiore o uguale a 3:1, mentre in seguito alla comparsa della CD si osserva un progressivo appiattimento della mucosa fino ad arrivare alla completa atrofia dei villi associata a ipertrofia delle cripte, con infiltrazione di cellule infiammatorie (plasmacellule, linfociti, eosinofili e mastcellule) (Rosekrans 1981)

Un altro effetto correlato allo sviluppo della malattia prevede una modificazione a livello delle giunzioni strette (*tight junctions*) tra gli enterociti della mucosa intestinale: in condizioni normali queste giunzioni impediscono il passaggio di macromolecole verso la lamina propria fungendo da barriera impermeabile, mentre nello stato di malattia si nota una modificazione citoscheletrica degli enterociti che permette la migrazione dei linfociti verso le cellule presentanti l'antigene (APC) che in questo modo possono attivarsi (Clemente M.G. 2003).

La classificazione dell'alterazione della mucosa più utilizzata è quella di Marsh che individua differenti stadi:

- stadio I o lesione infiltrativa: normale architettura dei villi con aumento dei linfociti intraepiteliali "linfocitosi".
- stadio II o lesione iperplastica: normale architettura dei villi con aumento dei linfociti intraepiteliali, iperplasia delle cripte
- stadio III o lesione distruttiva: atrofia dei villi associata ad iperplasia delle cripte ghiandolari, enterociti di superficie di altezza ridotta, con brush-border irregolare e vacuoli citoplasmatici, aumento del numero di linfociti intraepiteliali (Marsh M.N. 1992) (Figura 5).

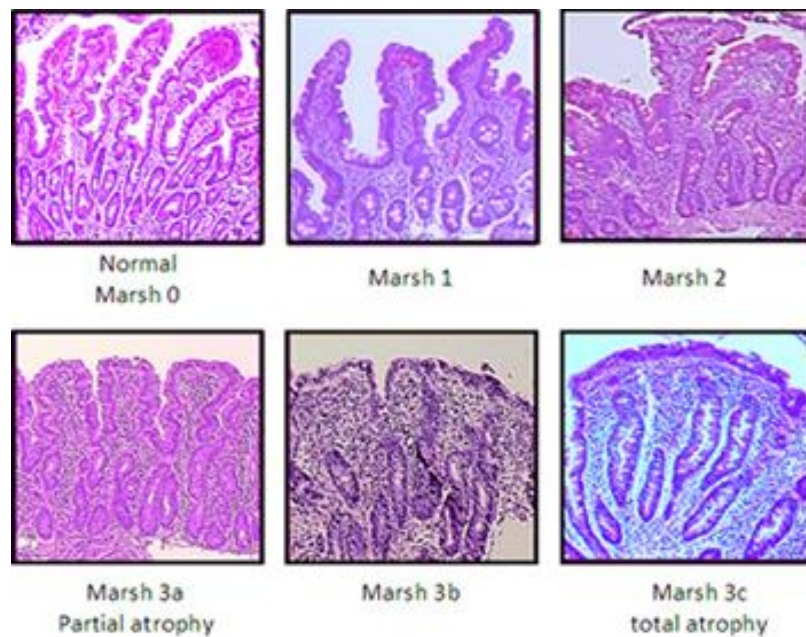


Figura 5 Classificazione danno tissutale nella celiachia

Inoltre esistono differenti marker sierologici (Anticorpi anti-gliadina (AGA), Anticorpi anti-endomisio (EMA), Anticorpi anti-transglutaminasi di tipo 2 (TG2)) che posso confermare la diagnosi di malattia celiaca. La positività di questi anticorpi conferma la glutine-dipendenza dell'atrofia dei villi con sicurezza. L'introduzione dei test sierologici ha consentito quindi di selezionare i soggetti da sottoporre all'esame istologico, riducendo il numero delle biopsie di conferma.

L'unico trattamento finora proposto è l'attuazione di una dieta priva di glutine (GFD, *Gluten Free Diet*) (Koning F.2005). La dieta porta alla remissione del danno alla mucosa, che riacquista così le sue caratteristiche fisiologiche e protegge dal rischio di sviluppare altre patologie autoimmuni associate alla celiachia (Schuppan D. 2000, van Heel D.A. 2006).

NON CELIAC GLUTEN SENSITIVITY (NCGS)

La sensibilità al glutine non celiaca (Non Celiac Gluten Sensitivity - NCGS) è stata originariamente descritta intorno al 1972 e 1978, ma solo nel 2011, una giuria internazionale di esperti riunitosi a Londra ha raggiunto il consenso su una definizione della patologia. La NCGS è stata definita come una condizione non-allergica e non autoimmune caratterizzata da sintomi intestinali ed extra-intestinali connessi all'ingestione di

alimenti contenenti glutine in soggetti non affetti da celiachia (CD) o allergia al frumento (WA) (Soares R.L.S. 2015, Catassi C. 2013).

Le cause della sensibilità al glutine di tipo non celiaco (non celiac gluten sensitivity = NCGS) sono ancora oggetto di studio e ricerca. Possono entrare in causa diverse componenti. In primo luogo il glutine, altre proteine del frumento, per esempio gli inibitori dell'amilasi, una famiglia di (almeno) cinque omologhe proteine a basso peso molecolare altamente resistente alla proteolisi intestinale in grado di stimolare l'immunità innata (Junker Y. 2012). In secondo luogo, i cosiddetti FODMAPs sono oggetto di numerose e controverse discussioni e sono stati indicati come la causa di alcuni sintomi in soggetti con intestino irritabile e pazienti NCGS. Dato che il grano è una delle principali fonti di FODMAPs, questo può spiegare i vantaggi della dieta priva di glutine. Tuttavia, va sottolineato che i FODMAPs non possono essere interamente ed esclusivamente responsabili dei sintomi presenti nei soggetti NCGS, poiché questi pazienti sperimentano una risoluzione dei sintomi durante una dieta aglutinata pur continuando ad ingerire FODMAPs da altre fonti, come legumi (una fonte molto più ricca di FODMAPs rispetto al grano) (Biesiekierski J.R. 2013).

Ad oggi la prevalenza complessiva della NCGS nella popolazione generale è tuttora sconosciuta, principalmente causata dal fatto che gran parte dei pazienti si è autodiagnosticata il disturbo e decide di intraprendere una dieta priva di glutine senza consulenza o parere medico. Secondo diversi studi condotti in diversi paesi come Nuova Zelanda, Stati Uniti, Italia e Regno Unito la prevalenza è estremamente variabile e può andare da 0,5% al 13% (Tanpowpong P. 2012, Di Giacomo D.V. 2013, Aziz I. 2014, Volta U. 2014). Inoltre alcuni studi dimostrano che esiste una sovrapposizione tra la sindrome dell'intestino irritabile (IBS) e la NCGS portando quindi ad una rivalutazione dell'aspetto epidemiologico. Secondo recenti indagini sulla popolazione adulta condotti nei paesi del Nord Europa, la prevalenza dell'IBS sarebbe compresa tra il 16 e il 25%. In un gruppo selezionato di adulti affetti da IBS, la frequenza della NCGS documentata tramite esperimento in doppio cieco controllato con placebo è risultata pari al 28%. Se una proporzione consistente dei pazienti affetti da IBS fosse affetta da NCGS, la prevalenza della NCGS nella popolazione generale potrebbe essere nettamente superiore a quella della CD (1%). Dal punto di vista genetico la Gluten Sensitivity presenta una positività per HLA-DQ2 e/o DQ8 nel 50% dei casi circa rispetto al riscontro di questi marker genetici nel 99% dei celiaci e nel 30% della popolazione generale (Catassi C. 2013).

La presentazione clinica della NCGS comprende sintomi gastrointestinali, come dolori e gonfiore addominali, nausea e sintomi extra intestinali come fatica, mal di testa, dolori articolari e muscolari, disturbi dell'umore e manifestazioni cutanee (ad esempio eczema o eruzioni cutanee) (Catassi C. 2013, Elli L. 2015). Questi sintomi compaiono a breve distanza dall'ingestione di glutine, scompaiono con l'astinenza da glutine e ricompaiono in seguito a challenge con glutine, a distanza di poche ore o qualche giorno.

Contrariamente a CD e allergia al grano, non ci sono chiari criteri sierologici o istopatologici per confermare la diagnosi di NCGS. La diagnosi di gluten sensitivity è infatti al momento una diagnosi di esclusione, caratterizzata dalla negatività dei test immunologici per l'allergia al grano (anticorpi di classe IgE diretti verso il grano e Prick test), dalla negatività per la sierologia tipica per celiachia (anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi) e da una biopsia intestinale normale o con alterazioni minime (Marsh 0 o Marsh 1 con incremento dei linfociti intraepiteliali, ma con villi assolutamente normali). La gluten sensitivity non dispone al momento di marcatori anticorpali specifici atti ad identificarla e l'unica alterazione immunologica che è possibile ritrovare è la positività per anticorpi antigliadina di prima generazione, AGA, che vengono ritrovati positivi nel 40-50% dei pazienti. Generalmente, la positività degli AGA nei casi di gluten sensitivity è di classe IgG, più raramente di classe IgA (Sapone A. 2012, Volta U. 2014).

ALLERGIA AL GRANO

L'allergia al grano è una delle reazioni immunomEDIATE che porta alla produzione di anticorpi di classe E. A differenza inoltre della celiachia, in cui l'attore principale è il glutine, nell'allergia al grano possono intervenire altri "attori", ossia altre componenti del grano oltre alle glutenine e gliadine (componenti del glutine); un esempio è costituito dall'inibitore dell'alfa-amilasi, presente nel grano e causa sia di reazioni allergiche respiratorie che alimentari. Un altro esempio sono le nsLTP ("non specific Lipid Transfer Protein"), una famiglia di proteine presenti nel regno vegetale (in particolare nelle Rosacee) e in alcuni pollini. Questa proteina può causare reazioni allergiche sia di tipo inalatorio che alimentare; si sospetta anche un effetto sensibilizzatore da contatto.

Queste fanno parte delle: albumine, prolammine e globuline. Ognuna di esse può provocare una reazione più o meno intensa.

Da un punto di vista clinico, l'allergia al grano si può manifestare come:

- allergia di tipo respiratorio: asma del panettiere o raffreddore allergico del panettiere, malattia tipicamente professionale, in cui la via di ingresso dell'allergene è la via inalatoria
- allergia alimentare, con le sue manifestazioni classiche, gastrointestinali, cutanee (es. orticaria, dermatite atopica nei bambini), bronchiali, nei bambini la dermatite atopica; nell'adulto si manifesta prevalentemente con quella che si definisce "analifilassi cibo dipendente esercizio indotta" (WDEIA)
- orticaria da contatto, che si osserva principalmente nei soggetti che per motivi di lavoro si trovano più a contatto con derivati del glutine; ma è presente anche ad esempio in quelle donne predisposte che utilizzano cosmetici che contengono idrolizzati proteici di glutine (Tovoli F. 2015)

Lo stato attuale della ricerca sulla prevalenza dell'allergia al grano non ha ancora permesso di giungere a dati univoci. La percentuale delle persone colpite da allergie alimentari oscilla tra l'11 e il 25%, mentre le popolazioni del Nord Europa sono più soggette all'allergia al grano di quelle del Sud Europa. Il motivo probabilmente risiede nella diversa alimentazione. Anche l'età influisce sull'incidenza: i bambini sono principalmente colpiti dall'allergia al grano classica che tende a scomparire con la crescita. Gli adulti soffrono invece di una forma permanente di allergia al glutine del grano o dell'anafilassi grano-dipendente indotta dall'esercizio fisico (wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis, WDEIA) (B. J. Sapone A. 2012).

Dato che i test disponibili non sono sempre in grado di diagnosticare in maniera univoca l'allergia al grano, è importante escludere preventivamente altre patologie quali la celiachia e la sensibilità al glutine non celiaca. La procedura diagnostica per l'allergia al grano è simile a quella per le altre allergie: per prima cosa vanno presi in esame i sintomi dell'allergia al grano riportati sul diario del paziente, seguono il dosaggio degli anticorpi specifici IgE e il prick test. I test allergometrici cutanei (Prick Tests) ed il dosaggio delle IgE specifiche (RAST) nel siero sono i test diagnostici di primo livello nella allergia al grano, tuttavia il valore predittivo di questi esami è inferiore al 75%, specialmente negli adulti, a causa di una cross-reattività con i pollini dell'erba. Inoltre molti reagenti per Prick Test in commercio hanno una bassa sensibilità poiché sono delle misture di proteine del grano idrosolubili e che quindi non hanno gli allergeni della frazione insolubile della gliadina. Negli ultimi anni sono state isolate e individuate come allergeni numerose

proteine del grano ed alcune di loro sono attualmente utilizzate nei test diagnostici in vitro, aumentandone l'accuratezza e la sensibilità.

Non c'è invece alcuna prova che individuare la presenza di anticorpi IgG anti-gliadina nel siero dimostri la presenza di malattia (Elli L. 2015).

MECCANISMI PATOGENETICI

La malattia celiaca è caratterizzata da una potente risposta immune sia di tipo innata che acquisita, scatenata dall'introduzione per via alimentare della gliadina. Entrambe sono necessarie per l'espressione fenotipica della patologia mentre singolarmente non sono in grado di scatenarla.

Affinché si realizzi la reazione immunitaria responsabile della malattia è necessario che la gliadina superi l'epitelio intestinale e raggiunga la lamina propria, sede in cui ha inizio la anomala risposta del sistema immunitario che porterà successivamente al danno tissutale (Lionetti P. 2002).

In condizioni fisiologiche l'epitelio intestinale, grazie alle giunzioni strette (*tight junctions*) intercellulari, forma una barriera al passaggio di macromolecole quali il glutine; solo piccole quantità di frazioni antigeniche, peraltro immunologicamente efficaci, supera la barriera epiteliale. Gran parte di queste proteine (>90%) oltrepassa la barriera attraverso la via transcellulare; durante questo percorso i peptidi subiscono una degradazione lisosomiale che li rende inattivi dal punto di vista immunologico. Le rimanenti frazioni antigeniche vengono invece trasportate intatte attraverso la via paracellulare grazie a una fine regolazione delle *tight junctions*, portando allo sviluppo di una risposta immunitaria che si traduce in uno stato di tolleranza antigenica (Fasano A. 2001). Nelle prime fasi della celiachia l'integrità delle *tight junctions*, e quindi la permeabilità dell'epitelio intestinale, risulta alterata; si assiste perciò ad un maggiore assorbimento di macromolecole, tra cui il glutine. Responsabile di questa aumentata permeabilità intestinale sembra essere la up-regulation della zonulina (peptide intestinale coinvolto nella regolazione delle *tight junctions*) (Schulzke J.D. 1998, Fasano A. 2000).

Una volta superata la barriera intestinale, la gliadina interagisce con un enzima extracellulare, la transglutaminasi 2 (TG2), che ha un ruolo fondamentale nella patogenesi. Questo enzima catalizza una reazione calcio-dipendente di deaminazione di uno specifico residuo glutammico, convertendo la glutamina in acido glutammico carico

negativamente. Dopo aver subito questa modifica la gliadina acquisisce una forte affinità per le molecole HLA-DQ2 e DQ8 poste sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (antigen presenting cells, APC) ai linfociti T-CD4⁺ (Schuppan D. 2000).

Questo processo avviene all'interno dei grandi aggregati di tessuto linfoide associato all'intestino (GALT) e nei linfonodi mesenterici che si trovano sparsi nel tratto gastrointestinale. I linfociti T CD4⁺ attivati migrano nella lamina propria attraverso i vasi sanguigni, pronti al contatto con l'antigene.

I linfociti T CD4⁺ si dividono in due sottopopolazioni distinte, Th1 e Th2. I linfociti Th1 indirizzano la risposta immunitaria attraverso il rilascio di citochine quali γ -interferone (IFN- γ) ed interleuchina 2 (IL-2) che stimolano la proliferazione ed il differenziamento dei linfociti T citotossici (CTL). I linfociti appartenenti alla sottopopolazione Th2, invece, indirizzano la risposta immunitaria in senso umorale dell'immunità acquisita, secernendo fattori quali interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5) ed interleuchina 10 (IL-10) che inducono la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B. In ogni caso, entrambi i tipi cellulari sembrano derivare da un precursore comune a profilo citochinico intermedio: i linfociti Th0.

È noto che la risposta immunitaria acquisita, indirizzata dai linfociti CD4⁺ Th1, gioca un ruolo centrale nella genesi della lesione tissutale a livello della mucosa intestinale (Monteleone G. 2001). Inoltre è stato recentemente dimostrato che, le cellule T a profilo Th1 gliadina-specifiche rilascino fattore di necrosi tumorale, che determinerebbe, a sua volta, la secrezione di metalloproteasi di matrice (MMPs) da parte dei fibroblasti intestinali. Le metalloproteasi di matrice così rilasciate causerebbero la dissoluzione del tessuto connettivo (Schuppan D. 2000). Queste ultime, dissolvendo il tessuto connettivo sottostante l'epitelio, aumentano il danno e permettono alle plasmacellule di migrare nella lamina propria e ai linfociti di raggiungere le APC. I linfociti T CD4⁺ così attivati producono grandi quantità di INF- γ che genera lo stato infiammatorio, riduce la resistenza delle giunzioni strette, aumentando la permeabilità alle cellule della risposta immunitaria e ai peptidi gliadinici, e stimola la secrezione degli anticorpi caratteristici della patologia (Stepniak D. 2006).

La principale citochina coinvolta nell'immunità innata è l'interleuchina 15 (IL-15), prodotta principalmente dalle cellule dendritiche ed epiteliali e dai macrofagi, con azione proinfiammatoria, che stimola la proliferazione di linfociti CD8⁺ con TCR α/β , cellule NK, linfociti TCR γ/δ e agisce come fattore di crescita per gli IELs (Gianfrani C. 2005).

Questa citochina regola la migrazione e l'attivazione degli IELs nel comparto intra-epiteliale e svolge un ruolo anti-apoptotico nei confronti dei linfociti, permettendo la sopravvivenza di cellule patogeniche; inoltre induce l'espressione, da parte delle cellule epiteliali, di molecole MHCII-simili (MICA e MICB) che fungono da recettori riconosciuti dalle cellule NK e dagli IELs TCR $\gamma/\delta+$ attraverso NKGD2. L'interazione MIC/NKGD2 induce la morte cellulare causando il danno all'epitelio che si osserva nella CD (Londei M. 2005). Il meccanismo attraverso cui l'IL-15 svolge il suo ruolo pro-infiammatorio sembra dipendere dalla capacità di inibire la via di trasduzione del segnale indotta dal TGF- β (Transforming Growth Factor- β) (Figura 6) (Kagnoff M.F. 2007).

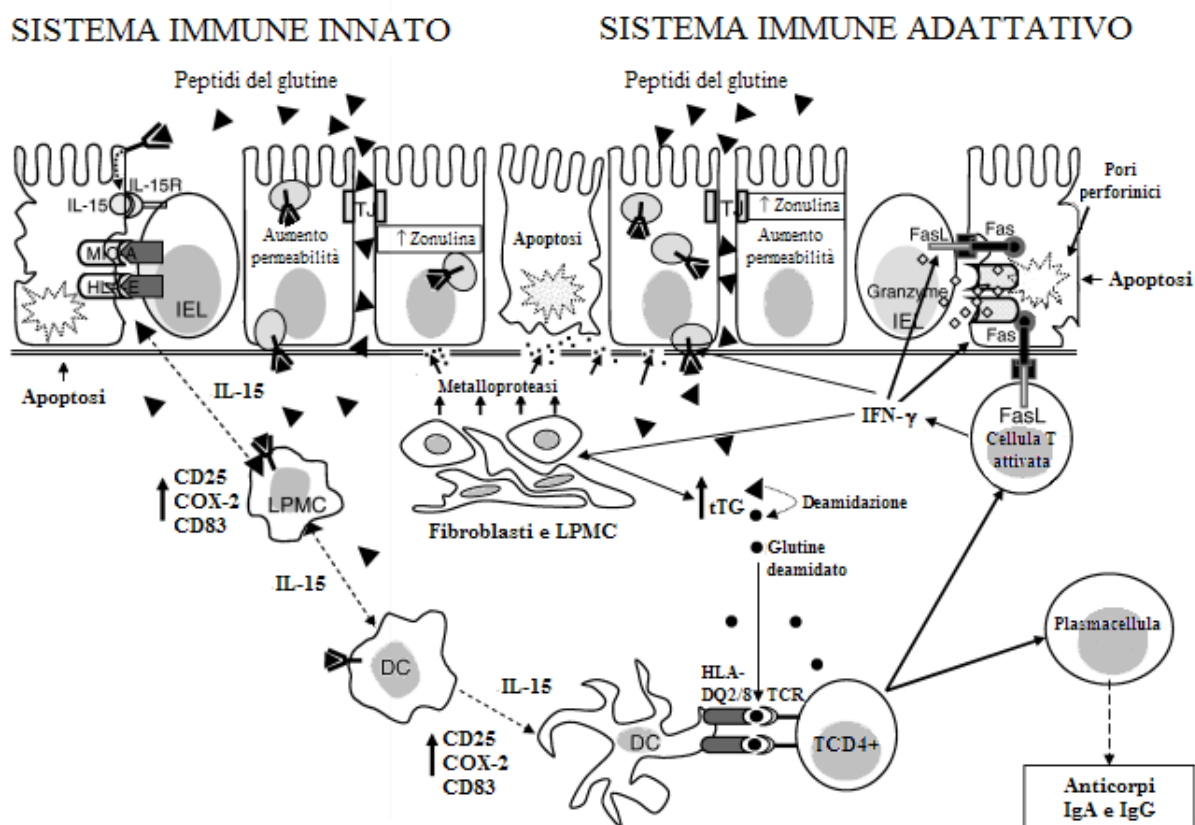


Figura 6 Meccanismo patogenico della malattia celiaca

La fisiopatologia della NCGS rimane ancora poco chiara. Uno studio condotto dall'Università di Baltimora (Maryland, USA) in collaborazione con Seconda Università degli Studi di Napoli ha fornito importanti elementi per definire i meccanismi patogenetici della gluten sensitivity. (Sapone A. 2011). Contrariamente alla celiachia, nella quale il sistema immune adattativo è up-regolato, nei pazienti con NCGS sembra essere coinvolto il sistema immunitario innato.

L'immunità innata è la prima risposta immunitaria che il corpo umano attua in caso di infezione da parte di agenti patogeni ed è più rapida dell'immunità adattativa.

I recettori dell'immunità innata sono proteine espressi da linfociti, macrofagi, granulociti neutrofili, cellule dendritiche, cellule epiteliali e cellule endoteliali. I principali recettori coinvolti nell'immunità innata sono i recettori Toll-like (TLR), recettori transmembrana espressi da macrofagi, granulociti neutrofili, cellule dendritiche, cellule dell'epitelio delle mucose e cellule endoteliali.

La maggiore espressione dei recettori Toll like di tipo 4 (TLR4) suggerisce la presenza di un'alterazione nella risposta immunitaria innata al glutine o ad altre sostanze associate al glutine contenute nel grano. Recenti studi identificano negli inibitori dell'amilasi/tripsina (ATI) una possibile causa scatenante per questa reazione. Anche i cosiddetti FODMAP potrebbero avere un ruolo nell'insorgenza dei sintomi gastrointestinali descritti nella sensibilità al glutine non celiaca.

TLR4 è un recettore tipico per un'immunità innata. La sua attivazione scatena una reazione infiammatoria. Nei pazienti affetti da sensibilità al glutine non celiaca non si riscontra alcuna alterazione nelle citochine che regolano le risposte immunitarie adattive, mentre sono presenti in maggiore concentrazione nei pazienti affetti da celiachia. A differenza dei celiaci, le persone colpite da sensibilità al glutine non celiaca mostrano una normale permeabilità intestinale e una over-espressione della claudina-4 e zonulina. Inoltre, contrariamente ai pazienti celiaci, si riscontra una significativa riduzione della molecola FoxP3, un importante marcatore delle cellule T-regolatrici

L'allergia al grano è una reazione avversa su base immunologica ad alcuni componenti del grano che può dare luogo a reazioni IgE mediate o cellule T mediate contro diverse proteine del grano. Il mastocita ha un ruolo cruciale nello sviluppo della patologia. Esso è posto anatomicamente in zone strategiche per la risposta immunitaria, come i vasi sanguigni, le mucose, i nervi. L'attivazione del mastocita avviene grazie un legame tra i recettori e le IgE. Un'altra tappa cellulare importante nel processo di ipersensibilità immediata di tipo I è quella determinata dalle cellule Th2: esse ricevono il segnale dalle cellule presentanti l'antigene (macrofagi e cellule dendritiche), dopo di che le Th2 si differenziano e producono varie citochine; queste ultime servono per attivare la produzione delle IgE da parte delle cellule B. I mastociti insieme ai basofili esprimono i recettori di membrana FcεR, dotati di elevata affinità per le IgE. Quando i mastociti sono ricoperti di IgE sulla superficie dopo una prima fase di sensibilizzazione, il successivo contatto con gli

antigeni determina il legame tra 2 molecole di IgE ed il recettore FcεR. Questo legame (antigene + 2 IgE + recettore FcεR) determina un'attivazione dei processi di trasduzione di segnale citoplasmatici del mastocita Ca^{2+} dipendenti, che comportano la fusione delle vescicole lisosomiali piene di mediatori, soprattutto di istamina, con la superficie interna della membrana del mastocita e conseguente liberazione dei mediatori chimici immagazzinati (Figura 7) (Cianferoni A. 2016).

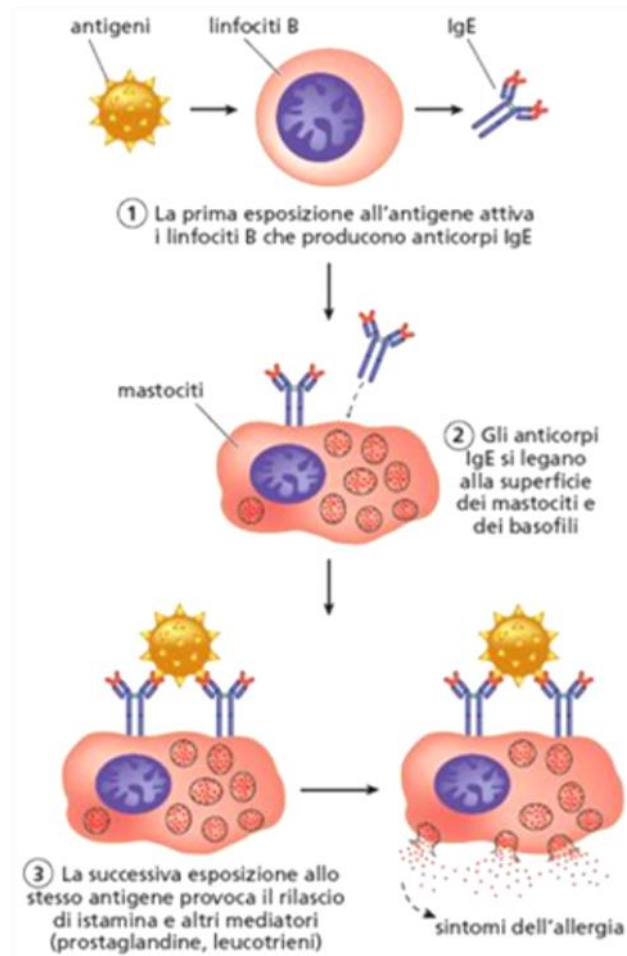


Figura 7 Patogenesi allergia IgE mediata

STRESS OSSIDATIVO

Il termine “stress ossidativo”, indica l’insieme delle alterazioni che si producono nei tessuti, nelle cellule e nelle macromolecole biologiche quando queste rimangono esposte ad un eccesso di agenti ossidanti, sia endogeni (ad esempio quelli prodotti dalle cellule infiammatorie) (Corti A. 2009) che esogeni (ad esempio gli inquinanti atmosferici, il fumo di sigaretta, le radiazioni) (Rahman I. 2006). Un corretto bilanciamento tra gli effetti di

sostanze ossidanti ed antiossidanti della cellula (il cosiddetto equilibrio ossido riduttivo o equilibrio redox) è essenziale per tutta una serie di funzioni fisiologiche, in quanto numerose proteine coinvolte nelle catene di trasduzione intracellulare dei segnali (recettori, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione) sono sensibili ad alterazioni anche lievi di tale equilibrio. È importante sottolineare che alterazioni lievi hanno un significato fisiologico, nella regolazione genica ed in alcune pathways di segnalazione cellulare.

Invece squilibri maggiori possono portare a diverse disfunzioni, quali danno cellulare, apoptosi e necrosi.

Lo stress ossidativo quindi deriva da un aumento dei ROS; queste molecole sono caratterizzate dall'avere una notevole reattività chimica che le rende molto instabili ed in grado di ossidare le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi, i residui amminioacidici delle proteine, i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici. Il danno ossidativo da parte dei ROS porta, in casi estremi, all'alterazione e alla compromissione della funzione di tutte le strutture e le macromolecole cellulari (Figura 8) (Klaunig J. E. 1992).

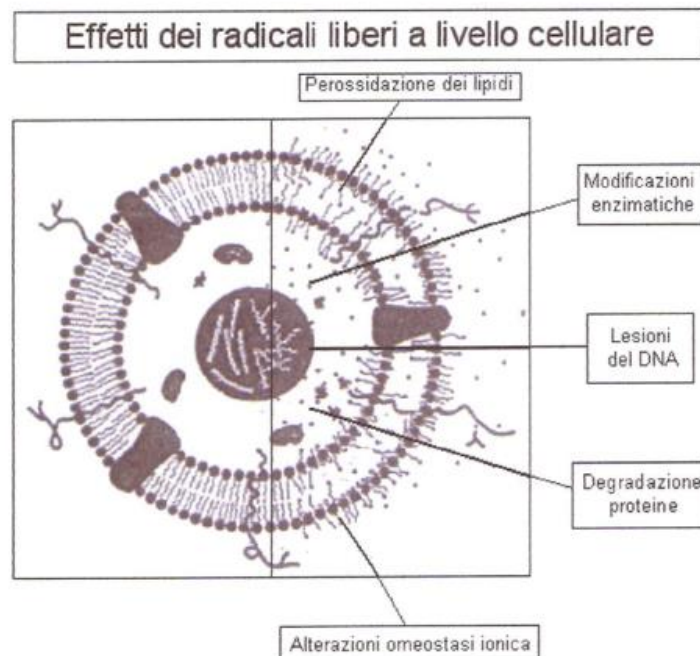


Figura 8 Danni dei radicali liberi a livello cellulare

Perossidazione lipidica

La perossidazione dei lipidi si ha a livello degli acidi grassi polinsaturi, contenuti in elevate concentrazioni soprattutto nei fosfolipidi delle membrane cellulari.

Il processo consiste in una serie di reazioni a catena in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano progressivamente in radicali lipidici ($L\bullet$), radicali perossidi ($LOO\bullet$) e perossidi lipidici ($LOOH$). Questi ultimi possono decomorsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici ($LO\bullet$), aldeidi (malondialdeide, MDA), alcani, epossidi lipidici e alcool. Anche il colesterolo può subire modificazioni dello stesso tipo dando origine a epossidi e alcool. In seguito a tali processi degenerativi, le membrane della cellula diventano rigide perdendo la fluidità e la funzione di permeabilità selettiva che le contraddistingue (Spiteller G. 2006).

Ossidazione delle proteine

Per quanto riguarda le proteine, le reazioni ossidative provocate dai radicali liberi hanno come conseguenza la proteolisi o la loro aggregazione aberrante. È stato dimostrato su proteine purificate che l'azione dei ROS altera completamente le proprietà chimico-fisiche caratteristiche della proteina stessa. È stato osservato infatti, sia una variazione del punto isoelettrico (causata da ossidazioni dei gruppi $-R$ degli amminoacidi mediante carbonilazione) (Davies K. J. 1987) sia un'alterazione del peso molecolare dovuta alla formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo D.C. 1990, Wolff S.P. 1986). Questi cambiamenti provocano l'attivazione di specifici enzimi proteolitici e conseguente degradazione della proteina (Dean R. T. 1993). La carbonilazione, laddove avvenga in maniera lieve e progressiva, è associata alla perdita irreversibile della funzione della proteina che viene eliminata dal proteasoma e dunque permette la sopravvivenza cellulare. L'eccessiva ossidazione e il conseguente cross-linking rende, invece, le proteine resistenti alla degradazione proteolitica e determina l'insorgenza della morte cellulare (Dalle Donne I. 1987).

Danni agli acidi nucleici

Per ciò che riguarda gli acidi nucleici, è stato dimostrato che le alterazioni ossidative inibiscono irreversibilmente i processi di trascrizione, traduzione e replicazione del DNA portando alla prematura senescenza e alla morte cellulare (Harman D. 1981, Schraufstatter I. 1988). Il danno ossidativo a carico del DNA può tradursi nella rottura dei filamenti

(doppi e singoli), nella formazione di legami crociati DNA-DNA (o DNA-proteine), scambio dei cromatidi fratelli, modificazione delle basi azotate. Tutti e quattro i nucleotidi, infatti, possono subire modificazioni ossidative, anche se le pirimidine (citosina e timidina) sembrano essere le più suscettibili ai processi di idrossilazione, saturazione, apertura o condensazione dell'anello imidazolico. Inoltre, la guanina può andare incontro alla formazione di un derivato ossidato, quale l'8-oxoguanina (8-oxoG) (Lawrence J. 2000). Data l'immediata vicinanza al sito di produzione dei ROS, il DNA mitocondriale rappresenta il primo bersaglio della tossicità dei ROS. Il DNA mitocondriale ha, infatti, una maggiore insorgenza di mutazioni spontanee rispetto a quello nucleare, data anche la relativa scarsa complessità dei sistemi di riparo del DNA in questo compartimento (Kakkar P. 2007). Inoltre, i mitocondri possono subire la cosiddetta transizione di permeabilità con conseguente attivazione della cascata delle caspasi e il rilascio del citocromo c, fattori che portano la cellula ad apoptosi (Galley H. F. 2011).

Sistemi antiossidanti

L'organismo combatte lo stress ossidativo utilizzando una serie di sistemi, enzimatici e non enzimatici che, con la loro azione, limitano il potenziale danno causato dalle specie reattive dell'ossigeno. Molti sistemi antiossidanti sono già presenti all'interno dell'organismo (antiossidanti endogeni); altri devono essere introdotti attraverso la dieta (antiossidanti esogeni).

In generale gli antiossidanti sono definiti come “qualsiasi sostanza che, presente in bassa concentrazione rispetto ad un substrato ossidabile, è in grado di rallentare o inibire l'ossidazione di quel substrato”, in questo modo substrati ossidabili come lipidi, proteine e DNA vengono protetti dall'ossidazione e rimangono inalterati (Frankel E.N. 2000).

I principali composti antiossidanti dell'organismo sono suddivisibili in 3 gruppi: antiossidanti endogeni, antiossidanti dietetici e proteine che legano metalli.

Gli antiossidanti endogeni, che rappresentano la prima linea di difesa, sono quegli enzimi endogeni che riducono la genesi di molte specie radicaliche e sono le superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi e la catalasi.

Superossido dismutasi (SOD)

La famiglia superossido dismutasi contiene 3 isoforme diverse con importanti differenze strutturali e di distribuzione. La differenza più eclatante è il metallo loro legato e possono essere distinte in CuZn SOD, Mn SOD e Fe SOD.

CuZn-SOD è una proteina dimerica di 32-kD che si trova nel citoplasma. Tuttavia, recentemente è stato rilevato nei lisosomi, perossisomi e nello spazio intermembrana mitocondriale. CuZn-SOD è presente in tutti i tessuti. Il CuZn-SOD accelera la dismutazione dell'O₂⁻, gli ioni rame svolgono questo ruolo attraverso ossidazioni e riduzioni. Lo ione zinco invece è importante per il mantenimento della struttura dell'enzima e si trova vicino al sito attivo.

Mn-SOD è un enzima di 40-kDa con quattro subunità che contiene uno ione Mn³⁺ nel sito catalitico, si trova nei mitocondri e la sua attività è dell'1 al 10% dell'attività SOD totale (CuZn-SOD più Mn-SOD). L'enzima gioca un ruolo fondamentale nella salvaguardia dei mitocondri dallo stress ossidativo e nella regolazione intramitocondriale di O₂²⁻ (Hermes-Lima M. 2004).

La Fe-SOD si trova nello spazio extracellulare, è sintetizzata solo da poche tipi di cellule, inclusi i fibroblasti e cellule endoteliali, ed è espressa sulla superficie delle cellule ed è in forma dimerica (Young I. S. 2001).

Catalasi (CAT)

La Catalasi è una proteina tetramerica di circa 240 kDa che contiene un gruppo eme ed una molecola di NADPH per subunità. L'enzima è localizzato principalmente nei perossisomi, ma piccole quantità sono presenti anche nei mitocondri; entrambi questi organelli sono responsabili d'intensa produzione di H₂O₂.

La funzione principale di questo enzima è quella di eliminare il perossido di idrogeno (H₂O₂) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua (Powers S. K. 2008).

Glutazione perossidasi

Sono state identificate cinque isoforme (GPX-1-GPX-5) che differiscono tra di loro per localizzazione cellulare e tissutale. Si tratta di enzimi selenio-dipendente che convertono H₂O₂ o gli idroperossidi organici ad acqua o alcoli (ROH) rispettivamente attraverso l'ossidazione di glutazione ridotto (GSH) (Powers S. K. 2008).

La forma "classica" di GPx (cGPx) è stato identificato negli eritrociti e ha la capacità di prevenire la degradazione ossidativa dell'emoglobina. Il cGPx è un tetramero, con un atomo di selenio per ogni subunità, è di dimensioni comprese 76-105 KDa a seconda della specie animale. Il selenio partecipa al ciclo catalitico di cGPx ed è presente come residuo selenocisteina al sito attivo (Hermes-Lima M. 2004).

Ruolo fisiologico dei ROS

I ROS non devono essere unicamente considerati molecole in grado di scatenare processi di morte cellulare.

A concentrazioni moderate, tuttavia, i ROS partecipano attivamente ad una varietà di processi biologici complessi, quali la trasduzione del segnale, il controllo dell'espressione genica, l'apoptosi, la senescenza cellulare e svolgono importanti funzioni a livello dei vasi modulando la contrazione e dilatazione (Das Sarma A., Finkel T. 2003). Nella cellula la trasduzione del segnale mediata dai ROS può seguire sostanzialmente due vie: 1) la fosforilazione delle proteine; 2) il cambiamento dello stato tiolico proteico. Entrambe sono responsabili dell'alterazione di una serie di processi intracellulari comprendenti la sintesi del DNA e dell'RNA, la sintesi proteica, l'attivazione enzimatica e spesso la regolazione del ciclo cellulare (Arrigo A. P. 1999, Suzuki Y.J. 1997, Nakamura H. 1997, Powis G. 1997, Rahman I. 2000, Shackelford R.E. 2000).

Il coinvolgimento dei ROS nella trasduzione del segnale non necessariamente implica una risposta tossica.

I ROS sono coinvolti in varie vie di segnalazione cellulare. In particolare, aumentando i livelli di catalasi, si inibisce la capacità del PDGF (platelet-derived growth factor) di attivare la fosforilazione sui residui di tirosina di molte proteine (Sundaresan M. 1996); e simili risultati sono stati ottenuti con l'EGF (Epidermal growth factor) (Bae Y.S. 1997). Questo fenomeno non è però limitato ai processi di segnalazione mediati dalle fosfo-tirosine, in quanto anche la trasduzione del segnale a valle dell'angiotensina II è alterato dalla modulazione dello stato redox (Ushio-Fukai M. 1996). Sebbene questi processi implicino un coinvolgimento dei ROS come mediatori della risposta ai fattori di crescita, molto rimane ancora da scoprire sui meccanismi attraverso i quali agiscono le specie ossidanti. Infatti, data la particolare natura delle vie di trasduzione, sembrerebbe probabile che, una volta generati, i ROS possano far parte di percorsi di trasduzione del segnale conosciuti e ben stabiliti. Tutto ciò potrebbe suggerire un ruolo di effettori diretti per i

ROS, per cui le interazioni con proteine bersaglio redox-sensibili si traducono in alterazioni della struttura e della funzione. Un esempio è rappresentato da ASK1, un membro della famiglia delle protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) coinvolte nell'attivazione delle protein chinasi attivate da stress (SAPK o la chinasi della porzione N-terminale di c-Jun – JNK) e della chinasi p38 (p38 MAPK). E' stato scoperto che la tioredossina forma un complesso con ASK1 in seguito al quale l'attività della chinasi viene inibita (Saitoh M. et al. 1998). L'aumento dei livelli di ROS in seguito alla stimolazione del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF- α) provocano la dissociazione del complesso ASK1/Trx e la successiva attivazione di ASK1 (Saitoh M. 1998, Gotoh Y. 1998).

Un altro modo attraverso cui i ROS possono alterare la trasduzione del segnale è l'ossidazione di specifiche cisteine, denominate reattive a causa del fatto che anche a pH fisiologico possono essere ossidate ad acido sulfenico.

Ad esempio, una tra le cisteine reattive ben caratterizzate è quella del fattore di trascrizione batterico OxyR la cui attività è sensibile ai cambiamenti dello stato redox (Zheng M. 1998). Anche le cellule di mammifero possiedono una grande varietà di proteine che contengono cisteine facilmente ossidabili; tra quelle coinvolte nella trasduzione del segnale, la più rilevante è la famiglia delle proteine tirosin-fosfatasiche. Tutti i membri di questa famiglia hanno una cisteina reattiva all'interno del sito attivo ed è stato ipotizzato che uno stress ossidativo può inattivare reversibilmente l'attività tirosin fosfatase attraverso la formazione di un gruppo sulfenato, o irreversibilmente attraverso la formazione di acido sulfinico (Finkel T. 2000).

Vari studi hanno mostrato che la produzione di ROS, in seguito al legame ligando/recettore, può essere sufficiente per regolare l'attività specifica di alcune proteine. Analisi condotte sulla protein tirosin fosfatasi 1B (PTP-1B), in seguito a stimolazione con EGF (Epidermal growth factor), suggerisce l'esistenza di un'inattivazione temporanea dell'attività fosfatase che corrisponde temporalmente con una massiccia produzione di ROS (Lee S.R. 1998).

Anche la trascrizione è un evento regolato dalle variazioni dell'ambiente ossido-riduttivo intracellulare. Molte sono le evidenze riportate in letteratura riguardo a modulazioni dell'attività trascrizionale da parte delle variazioni ossido-riduttive, anche se la maggior parte riguardano esperimenti *in vitro* condotti su proteine purificate.

Tra i fattori di trascrizione eucariotici per i quali è stata ipotizzata una regolazione di tipo redox c'è il soppressore tumorale p53. È stato dimostrato che p53 è un fattore trascrizionale in grado di legarsi a siti specifici del DNA più facilmente in un ambiente riducente (Wu H.H. 1998, Fojta M. 1999), e che, mutazioni a carico di alcuni residui di cisteina presenti nel core del dominio di legame, prevengono l'induzione della trascrizione (Rainwater R. et al. 1995). Un altro esempio di regolazione della trascrizione da parte dei ROS è rappresentato da NF- κ B. Infatti, diverse evidenze suggeriscono un coinvolgimento dei ROS come intermedi comuni nei vari segnali che attivano NF- κ B. Queste conclusioni si basano essenzialmente sull'inibizione dell'attivazione di NF- κ B compiuta sia attraverso trattamenti con molecole antiossidanti, sia mediante sovraespressione degli enzimi antiossidanti. Comunque, anche se il blocco dell'attività trascrizionale è inequivocabile, il grado di inibizione sembra dipendere dal tipo cellulare e dallo stimolo utilizzato (Finkel T. 1998).

Il meccanismo mediante il quale i ROS esercitano il loro effetto cellulare nell'endotelio dipende dalla loro capacità nel modulare l'espressione e la funzione di geni vascolari, come il vascular endothelial growth factor (VEGF), il fibroblast growth factor (FGF) ed il platelet-derived growth factor (PDGF), i quali giocano un ruolo aterogenico nella regolazione della crescita cellulare e nel differenziamento (Eyries M. 2004).

Stress ossidativo e infiammazione

Diversi studi hanno dimostrato come lo stress ossidativo è uno dei meccanismi che può giocare un ruolo importante nella tossicità gliadina.

Infatti alcuni peptidi alfa-gliadina in special modo P31-43 possiedono la capacità di penetrare nelle cellule e accumularsi nei lisosomi portando all'attivazione di alcune vie di trasduzione del segnale e all'aumento dei livelli di radicali liberi (specie reattive dell'ossigeno, ROS e specie reattive, RNS) (figura 9) (Zimmer K.P. 2010).

Utilizzando differenti modelli cellulari, è stato riportato che l'esposizione di gliadina porta ad uno squilibrio ossidativo intracellulare, caratterizzato da un aumento dei livelli di prodotti di perossidazione lipidica (4-idrossi-2 (E) -nonenal (4-HNE)), un aumento nel rapporto di glutatione ossidato (GSSG) / ridotto (GSH) e una diminuzione di gruppi sulfidrilici legati alle proteine (Luciani A. 2010). Inoltre l'aumento del danno ossidativo potrebbe indurre alterazioni nella morfologia delle cellule, proliferazione cellulare, apoptosi e vitalità cellulare (Elli L. 2003, Di Sabatino A. 2001).

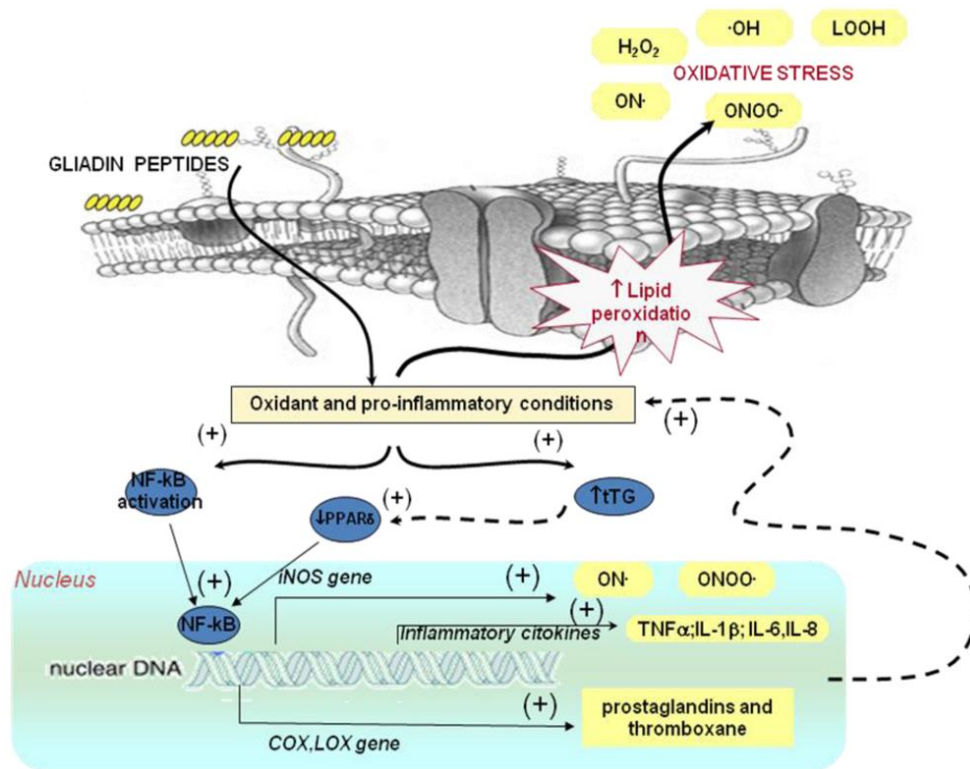


Figura 9 Effetto del glutine sullo stress ossidativo

Inoltre l'aumento dei livelli di ROS determina una minore degradazione della TG2 da parte del sistema ubiquitina-proteasoma con conseguente aumento dei livelli di questo enzima e successivo danneggiamento della mucosa intestinale. L'alterazione dell'asse ROS - TG2 indotta dai peptidi gliadinici scatena un'attività incontrollata del sistema infiammatorio e attivazione di specifici fattori trascrizionali con conseguente aumento di citochine infiammatorie (Thomas K.E. 2006).

Infatti qualora i sistemi di antiossidazione non siano efficienti nel mantenere lo stato redox cellulare, l'escalation ossidativa condurrebbe ad attivazione della cascata delle MAPKs con conseguente espressione di citochine proinfiammatorie, chemochine e molecole di adesione (De Martin R. 2000). Tale espressione avviene sotto il controllo del fattore di trascrizione Nuclear Factor (NF-κB), il primo fattore di trascrizione redox-sensibile che è stato dimostrato rispondere direttamente allo stress ossidativo.

L'NF-κB ("nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells") è un complesso proteico che si può trovare in tutti i tipi di cellule ed è interessata in tutte le reazioni delle cellule agli stimoli, quali stress, citochine, radicali liberi, irradiazione con ultravioletti e

attacco proveniente dagli antigeni dei batteri o virus (Gilmore T.D. 1999). NF- κ B gioca un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria.

In assenza di uno stimolo infiammatorio, NF- κ B è localizzato nel citoplasma complessato con una proteina inibitoria chiamata I κ B (Inhibitor of NF- κ B), la quale maschera la sua sequenza di localizzazione nucleare (*Nuclear Localization Signal*, NLS). Quando uno stimolo extracellulare attiva la via di NF- κ B si attivano le IKK, chinasi specifiche per I κ B, che fosforilano I κ B α , promuovendo la reazione di poliubiquitinazione sulle lisine e quindi la rapida degradazione di I κ B. In sua assenza è dunque smascherata la sequenza di localizzazione nucleare e NF- κ B può migrare nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni bersaglio (Tak P.P. 2001).

Infatti dopo la sua attivazione si verifica un aumento della produzione di molte proteine infiammatorie come ad esempio ciclossigenasi 2, la fosfolipasi A2, INF- γ , interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6 e IL-8 (Figura 9) (Vincentini O. 2011).

Il risultato è un aumento dell'infiammazione e dello stress ossidativo.

A livello molecolare i mediatori tra alimentazione, ambiente, metabolismo e infiammazione sono principalmente i recettori PPAR γ che a loro volta se attivati, inibiscono NF- κ B spegnendo l'infiammazione e le risposte autoimmuni. Nel caso della celiachia e intolleranze al grano si ha una down regolazione di questo gene determinata dalla presenza di ROS e attivazione dell'enzima transglutaminasi 2, causando così un continuo processo infiammatorio. (Zimmer K.P. 2010, Thomas K.E. 2006).

TRANSGLUTAMINASI 2

La transglutaminasi 2 (TG2) è un enzima ubiquitario calcio-dipendente, localizzato principalmente nel citosol, con una piccola frazione che risulta ancorata alla membrana cellulare, ma può essere trovata anche in altri compartimenti cellulari come nucleo e mitocondri. Queste differenti localizzazioni caratterizzano le sue diverse funzioni, tra cui differenziamento cellulare, l'apoptosi e il metabolismo del glutine (Caputo I. 2004).

Appartiene alla famiglia delle transglutaminasi, di cui fanno parte anche tre enzimi intracellulari (TG1 specifica dei cheratinociti, TG3 e TG5 specifici dell'epidermide), due enzimi extracellulari (fattore XIII della coagulazione e TG4 o fattore prostatico) e due enzimi non ancora caratterizzati (TG6 e TG7) (Griffin M. 2002).

La TG2 è espressa in diverse cellule tra cui cellule endoteliali, macrofagi tessuto connettivo, fibroblasti, osteoblasti, epatociti e cheratinociti epidermici.

Nell'intestino, l'enzima è presente in grande quantità nella lamina propria e sembra essere implicata in numerose patologie come disturbi neurodegenerativi, cancro, disturbi infiammatori e autoimmuni, tra cui la celiachia.

A livello intestinale, quando non vi sono ammine accettrici disponibili, la transglutaminasi catalizza la trasformazione della glutamina in acido glutammico, carico negativamente, attraverso la reazione di deaminazione. L'acquisizione di cariche elettronegative da parte dei peptidi di gliadina, modificati dalla reazione di deaminazione, permette a questi ultimi di legare più avidamente le molecole HLA-DQ2 e DQ8 sulle cellule presentanti l'antigene (APC) con conseguente attivazione della risposta dei linfociti T per la gliadina (Schuppan D. 2000).

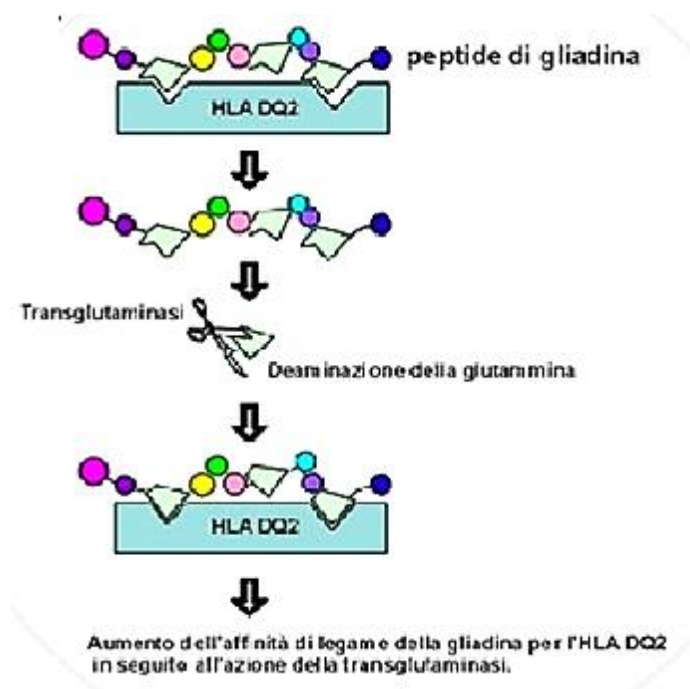


Figura 10 Processo di deaminazione da parte della Transglutaminasi 2

Data l'elevata presenza di anticorpi anti-transglutaminasi nei pazienti celiaci è stato dimostrato che questi anticorpi hanno un ruolo nello sviluppo della lesione mucosale tipica della celiachia. Questi anticorpi hanno infatti un parziale effetto inibitorio dose dipendente nei confronti dell'attività di transaminazione della TG2 umana: infatti la presenza degli

anticorpi anti-TG2 determina una mancata attivazione del TGF- β , il fattore stimolante del differenziamento degli enterociti (attivato da una modificazione indotta dalla stessa TG2) determinando il mancato differenziamento dell'epitelio con conseguente appiattimento dell'epitelio dei villi.

Il processo di attivazione dei linfociti T della lamina propria è quello che avvia una cascata di eventi, quali la produzione di un pattern di citochine di tipo Th1 che a loro volta attivano i macrofagi, inducendo la sovrapproduzione di interleuchina 12 (IL-12), IL-6, Tumor Necrosis Factor (TNF- α) e metalloproteinasi (16-17), capaci di degradare la matrice extracellulare, provocando l'appiattimento della mucosa intestinale che culmina, infine, nell'atrofia dei villi intestinali. Si innesca infatti, un meccanismo di produzione di ossido nitrico in cui è coinvolto TNF- α , e aumentata apoptosi enterocitaria. IL-6 invece concorre alla differenziazione, durante la fase di risposta acuta, dei linfociti B in plasmacellule produttrici immunoglobuline specifiche. Inoltre durante il processo infiammatorio si ha un rilascio sempre maggiore di TG2, dovuto all'azione di alcune citochine; in questo modo aumentano le modificazioni della gliadina da parte dell'enzima, con conseguente aumento della produzione degli auto-anticorpi.

Resta ancora in questione dove e quando la deamidazione del glutine avvenga. La TG2 è essenzialmente attiva solo in presenza di livelli millimolari di Ca^{2+} . Quando l'enzima è attivato, subisce un grosso cambio conformazionale in cui i residui C-terminali sono spostati di circa 120 Å (Pinkas D.M. 2007).

La concentrazione intracellulare di Ca^{2+} è bassa e strettamente controllata, invece quella dell'ambiente extracellulare è alta, così è stato assunto che la TG2 extracellulare è enzimaticamente attiva. Tuttavia, un recente studio ha rivelato che la maggior parte della tTG extracellulare è inattiva, nonostante l'ambiente favorevole per l'attivazione enzimatica e che essa può essere enzimaticamente attivata da appropriati segnali lesivi (Siegel M. 2008). Queste nuove indicazioni sulla biologia della TG2, suggeriscono che le modificazioni post-traslazionali dei peptidi del glutine, osservati nella malattia celiaca, possano verificarsi solo in presenza di esistenti danni tissutali, così come quelli causati dall'infezione o infiammazione negli stadi iniziali della malattia (Shuo-Wang Qiao 2009). La presenza della TG2 sulla superficie delle APC lascia pensare che questo complesso partecipi direttamente alla deaminazione dei peptidi del glutine, e probabilmente facilita anche l'accumulo di epitopi del glutine enzimaticamente complessati alla TG2, ma nessuna evidenza a supporto di tale ipotesi è stata ottenuta (Raki M. 2007).

Perciò al momento non si è stabilito se la TG2 è presente sulla superficie delle cellule APC, e se così fosse, se questo complesso partecipa alla deaminazione dei peptidi del glutine, oppure aumenta l'accumulo degli antigeni del glutine.

MODELLO CELLULARE

Il modello cellulare utilizzato è stato quello delle cellule di adenocarcinoma colonrettale umano.

L'epitelio intestinale contiene una popolazione eterogenea di cellule quali gli enterociti (cellule deputate all'assorbimento), cellule di Paneth, cellule M, cellule a ciuffo e cellule a coppa (Madara J. 1986). Gli enterociti sono senz'altro le cellule più abbondanti (80-90% del totale delle cellule epiteliali) e costituiscono il sistema di assorbimento dell'intestino tenue (Shah P. 2006). Nel 1974, Jorgen Fogh prese come modello la linea cellulare Caco-2 da un adenocarcinoma coloretale umano e in pochi anni esso divenne il modello cellulare per lo studio dell'assorbimento intestinale *in vitro* (Figura 11) (Fogh J. 1975).

Le cellule Caco-2 quando raggiungano la confluenza diventano differenziate e polarizzate tale che il loro fenotipo, morfologicamente e funzionalmente, assomiglia agli enterociti che rivestono l'intestino tenue. Il monostrato, costituito dalle cellule sono unite da complessi giunzionali che comprendono giunzioni strette e desmosomi.

Osservando le colture cellulari Caco-2 al microscopico, è evidente anche mediante ispezione visiva che le cellule sono eterogenei. Di conseguenza, nel corso degli anni le caratteristiche delle cellule utilizzate in diversi laboratori nel mondo hanno prodotto differenti risultati, il che rende difficile confrontarli tra loro (Sambuy Y. 2005).

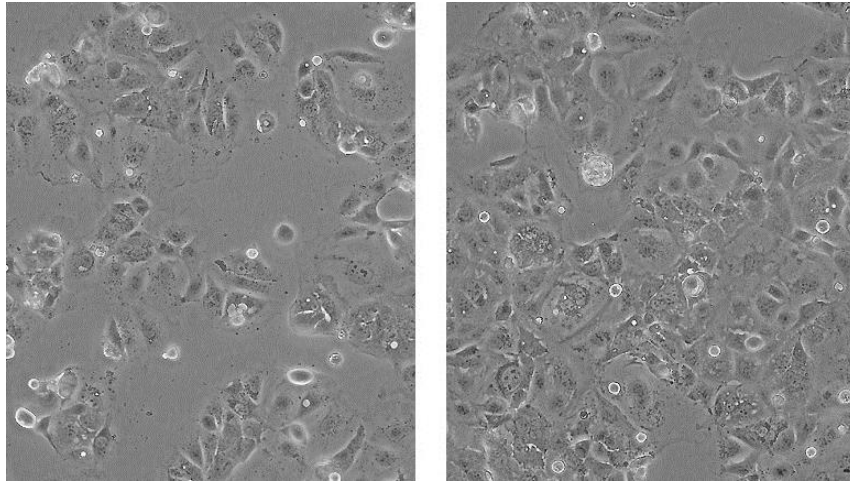


Figura 11 Cellule Caco-2 a due differenti stadi di crescita

In base a queste caratteristiche le cellule Caco-2 vengono utilizzate come ottimo modello di assorbimento intestinale e la comprensione degli effetti della gliadina nelle patologie associate.

In molti studi si è potuto dimostrare come i peptidi gliadinici siano in grado di indurre arrangiamento dell'actina, proliferazione e squilibrio ossido-riduttivo intracellulare e apoptosi nelle cellule Caco-2 (Rivabene R. 1999, Giovannini C. 2000).

Inoltre questo modello è stato utilizzato per valutare la compromessa funzione della barriera intestinale nella malattia celiaca. Infatti la gliadina è in grado stimolare la produzione di numerose citochine come IFN- γ e TNF- α andando quindi ad influenzare l'espressione di diverse proteine giunzionali epiteliali (ad esempio occludina e zonulina) e la permeabilità delle cellule Caco-2 (Sander G.R. 2005).

Per riprodurre al meglio le condizioni esistenti all'interno dell'intestino *in vivo* le cellule Caco-2 sono più comunemente utilizzati non come singole cellule, ma come un confluente monostrato su un filtro inserito nella coltura cellulare (ad esempio, Transwell).

Sebbene il monostrato Caco-2 presenti tutti i vantaggi di predire l'assorbimento e possiede la maggior parte delle caratteristiche morfologiche e biochimiche dell'epitelio intestinale, esistono comunque delle limitazioni. Infatti, le cellule Caco-2 hanno mostrato una bassa espressione di molti trasportatori presenti *in vivo* nel tessuto intestinale (Gres M.-C. 1998).

Per quanto riguarda la via paracellulare, il modello Caco-2 mostra una più bassa permeabilità in confronto con l'intestino umano; ciò sembra essere dovuto ad un minor numero di tight junctions aperte nel modello *in vitro* e ad una minore superficie di assorbimento come conseguenza dell'assenza di villi assiali (Artrusson P. 2001).

Altri fattori che riducono la permeabilità del modello cellulare Caco-2 rispetto all'epitelio intestinale *in vivo* includono l'assenza del controllo da parte del sistema nervoso centrale e l'assenza della circolazione sistemica, una minore velocità di turnover cellulare, l'assenza di muco e sali biliari e dei movimenti peristaltici (Sambuy Y. 2005).

SCOPO DELLA RICERCA

La mucosa intestinale è un'enorme superficie esposta continuamente ad un elevato numero di antigeni, ossidanti derivanti dalla dieta, mutageni e cancerogeni così come da specie reattive dell'ossigeno generate endogenamente (Aw T.Y. 1999).

Il sistema immunitario dell'intestino deve essere in grado di proteggere la mucosa contro i patogeni, ma anche di evitare reazioni di ipersensibilità verso le proteine alimentari, la normale flora batterica ed altre macromolecole presenti nell'ambiente intestinale. E' infatti noto che le reazioni contro gli alimenti hanno una base immunologica e possono derivare da una rottura della tolleranza verso i componenti della flora intestinale o verso alcuni antigeni contenuti negli alimenti stessi. Questo può portare allo sviluppo di risposte immunitarie della mucosa dirette contro gli autoantigeni e quindi alla comparsa di malattie autoimmuni. Tuttavia queste situazioni non sono molto frequenti, grazie alla capacità del sistema immunitario intestinale di discriminare gli antigeni alimentari da quelli di importanza immunologica tramite il processo di tolleranza orale. Negli ultimi anni, le manifestazioni di allergie alimentari (glutine), disturbi atopici e malattie autoimmuni sono in continuo aumento nelle società occidentali.

Come già detto nell'introduzione, il grande aumento nell'insorgenza di tali disturbi non sembra essere attribuito esclusivamente a fattori genetici, ma sarebbe dovuto ad un miglioramento delle tecniche di coltivazione con utilizzo di pesticidi e fertilizzanti e il differente processo di lievitazione del pane e dei prodotti da forno.

Inoltre per preservare l'integrità cellulare e l'omeostasi tissutale, l'intestino possiede diversi meccanismi di difesa come la capacità di mantenere elevate concentrazioni di antiossidanti (glutathione, tocoferolo e acido ascorbico), regolare i sistemi enzimatici antiossidanti (glutathione perossidasi, glutathione reduttasi e superossido dismutasi) e indurre la morte cellulare per apoptosi in enterociti mal funzionanti o danneggiati (Aw T.Y., 1999).

Uno squilibrio tra i meccanismi di difesa, enzimatici e non enzimatici, e la produzione di specie ossidanti, in favore di queste ultime, genera quello che viene definito "stress ossidativo". Lo stress ossidativo è oggi considerato una possibile causa di specifiche alterazioni strutturali e funzionali dei tessuti nel tratto gastrointestinale, come in caso di

infiammazione, riossigenazione post-ischemica, intossicazione da xenobiotici, iperossia ed in talune fasi della carcinogenesi.

Questo tipo di squilibrio e quindi l'aumento di specie reattive possono creare diverse problemi dal punto di vista cellulare. In quanto sono in grado di intaccare le macromolecole come lipidi, proteine e DNA.

Partendo da questa considerazione in questo studio si è voluto valutare una possibile correlazione tra lo stress ossidativo e il danno genotossico indotto dalla gliadina.

A questo scopo è stato utilizzato come modello una linea cellulare stabilizzata Caco-2 di adenocarcinoma colonrettale umano molto utilizzata per questo tipo di studio, date le sue caratteristiche precedentemente descritte.

Inoltre studi in letteratura hanno dimostrato che l'aumento di specie radicaliche con conseguente stress ossidativo induce all'aumento di un particolare enzima, la Transglutaminasi 2. Infatti questo enzima è coinvolto in diversi processi sia di tipo immunologici che infiammatori. Inoltre come spiegato in precedenza è un enzima ubiquitario e si trova localizzato in diverse compartimenti cellulari dove svolge diverse funzioni, quali rimodellamento cellulare e apoptosi.

Per queste ragioni nel nostro studio abbiamo voluto analizzare sia l'espressione della transglutaminasi 2 in diversi compartimenti cellulari che la presenza di un processo apoptotico indotto da gliadina digerita.

Inoltre per rendere lo studio paragonabile ad una situazione reale, la valutazione dello stress ossidativo è stata effettuata analizzando principali marker sierologici in pazienti celiaci. Mentre per la valutazione del danno genotossico oltre ad una valutazione in vitro, sono stati utilizzati alcune biopsie di pazienti celiaci per confermare la presenza di danno al DNA indotta da ROS.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Le cellule Caco-2 sono state fatte crescere con un terreno Dulbecco con aggiunta di 0.2 mM L-glutammina, 1% amminoacidi essenziali (Euroclone), 5 U/ml penicillina, 5µg streptomicina e 10% (v/v) di siero bovino fetale (Euroclone) e mantenuti in incubatore con 5% CO₂ a 37°C.

In tutti i nostri esperimenti le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni di gliadina digerita (da 125 a 1000 µg/mL) per 24 ore.

DIGESTIONE ENZIMATICA DELLA GLIADINA

La digestione enzimatica della gliadina è stata effettuata utilizzando il protocollo messo a punto da Friis *et al.* (Friis S. 1992).

Inizialmente 1 grammo di gliadina è stata sciolta in 10ml di 0.1 mol/l HCl, successivamente è stato aggiunto 20 mg di pepsina e incubato in agitazione per 2 ore a 37°C. Il pH è stato aggiustato intorno ad 8 aggiungendo 5.0 mol/l NaOH. Dopo questo fondamentale passaggio è stato aggiunto 20 mg di tripsina e mantenuto in agitazione per 4 ore a 37°C.

L'inattivazione della tripsina è stata effettuata portando la soluzione a 90°C per 3 minuti. Il materiale insolubile è stato rimosso mediante centrifugazione (10000xg, 30 minuti) e il surnatante è stato sterilizzato mediante filtrazione.

Prima dell'utilizzo della gliadina nei nostri esperimenti è stato effettuato un dosaggio proteico per valutare con precisione la resa della digestione.

TEST DI CITOTOSSICITA' (MTT TEST)

L'MTT è un test colorimetrico utilizzato per misurare la vitalità cellulare attraverso la valutazione della funzionalità mitocondriale. Questo test si basa, infatti, sull'attività dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi nei confronti del colorante bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol--2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich) che, nelle cellule vive,

viene convertito nel sale insolubile formazano. La quantità di formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive e dunque vive. L'MTT test permette quindi di evidenziare l'azione citotossica di una sostanza che si definisce tale quando si osserva una diminuzione della vitalità cellulare pari almeno al 30%, rispetto al controllo, a cui si attribuisce il 100% di vitalità.

Le cellule sono state piastrate in multiwell da 96 pozzetti (corning) in un terreno completo per almeno 24h prima del trattamento. Al momento dell'esperimento la confluenza non doveva superare l'80%. Il trattamento è stato effettuato con diverse concentrazioni di gliadina per 24h.

Al termine del trattamento il terreno è stato aspirato, i pozzetti sono stati lavati con 100 µl di PBS (tampone fosfato salino), e una volta tolto sono stati aggiunti 20 µL di soluzione di MTT (5mg/ml in PBS) diluiti in terreno completo 1:10. Le piastre sono state incubate per 3h a 37°C. Al termine del tempo prestabilito l'MTT è stato rimosso e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 150µl di DMSO in modo da lisare la parete cellulare e favorire la liberazione dei Sali di formazano prodotti. Le piastre vengono fatte agitare per 5 minuti a temperatura ambiente e poi sottoposte alla lettura allo spettrofotometro (Multilabel counter Victor Wallac 1420) alla lunghezza d'onda di 550 nm.

I risultati sono espressi come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo negativo, a cui viene attribuita una vitalità del 100%.

TEST DI VALUTAZIONE DI ROS

Per saggiare il contenuto intracellulare di ROS, si utilizza una sonda 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA Sigma). Questa è una molecola non polare è in grado di diffondere in cellula viene idrolizzata da un'esterasi intracellulare trasformandosi nel composto polare e non fluorescente 2',7'-diclorofluoresceina (DCFH). In presenza di ROS (principalmente H₂O₂) la DCFH viene ossidata convertendosi nel composto fluorescente DCF. L'intensità della fluorescenza dunque sarà proporzionale alla quantità di ROS presenti nel campione preso in esame.

Valutazione ROS tramite fluorimetro multipiastra

Le cellule sono coltivate in piastre da 96 pozzetti nere (Greiner Bio-one). Una volta che le cellule hanno raggiunto l'80% di confluenza, si aspira il terreno di coltura e si effettua il

trattamento con gliadina digerita. Dopo il trattamento, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state incubate con 100µl DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 20µM e si incuba per 30 minuti a 37°C con 5% CO₂. Successivamente si aspira il terreno, si lava ogni pozzetto con 100µl di PBS e si effettua direttamente la lettura al fluorimetro multipiastra (Multilabel Counter Victor 2 Wallac 1420) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm (Wang H. 1999). I valori di ROS ottenuti sono stati normalizzati sul quantitativo proteico (metodo di Lowry et al.) ed espressi come ROS/µg di proteine.

Dosaggio delle proteine

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato secondo il metodo di Lowry e collaboratori (1951), utilizzando come standard di riferimento l'albumina. L'esperimento è condotto in piastre a 96 pozzetti. In ogni pozzetto con cellule si aggiungono 100 µl di NaOH 0.1 M. Si prepara poi il 'bianco', lo 'standard' e il 'bianco dello standard' aggiungendo, rispettivamente, e nei corrispondenti pozzetti privi di cellule, 100 µl di NaOH 0.1 M, (nel caso della lipoperossidazione il bianco è rappresentato dal PBS) 100 µl di albumina e 100 µl di H₂O distillata. Si aggiungono in tutti i pozzetti 125 µl di reattivo, si agita per 10 minuti, si mettono 25 µl di Folin diluito 1:2 in H₂O e si agita per 30 minuti. Si effettua una lettura immediata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 550 nm (Multilabel Counter Victor 2 Wallac 1420).

Composizione reattivo: 15 ml soluzione A, 15 ml H₂O distillata, 0.3 ml di soluzione B, 0.3 ml di soluzione C.

Soluzione A: 4 g NaOH, 20 g Na₂CO₃, in 500ml di H₂O distillata

Soluzione B: tartrato di Na 2%

Soluzione C: solfato di Cu 1%.

VALUTAZIONE IMMUNOENZIMATICA

Tutti i campioni sono stati valutati con il metodo immunoenzimatico utilizzando un lettore di micropiastre in spettrofotometria (Infinite M200, Tecan, Austria). Tutte le

determinazioni del campione sono state valutate in duplice copia e il coefficiente di variazione era nella gamma indicata dal produttore del kit.

La capacità antiossidante totale del plasma (TAC) è stata misurata con un kit enzimatico (Cayman Chemical, Stati Uniti d'America). Questo test si basa sulla capacità di antiossidanti presenti nel plasma di inibire l'ossidazione di 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline) solfonico (ABTS) al radicale cationico $ABTS^+$ da parte di una perossidasi. Il prodotto $ABTS^+$ ottenuto è stato valutato misurando i segnali di assorbanza a 750 nm. La concentrazione antiossidante è proporzionale alla soppressione del segnale di assorbanza. La TAC è stata valutata mediante il Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbossilico), impiegato come standard di confronto che è stata espressa come la concentrazione della capacità antiossidante di Trolox (mM).

L'accumulo di proteine ossidate è stata misurata come contenuto di carbonili reattivi.

Un kit specifico per le proteine carboniliche (PC) (Cayman Chemical, USA) è stato utilizzato per valutare le proteine ossidate colorimetricamente a 370 nm. I valori delle proteine ossidate ottenute sono stati normalizzati alla concentrazione proteica totale nel pellet finale (lettura dell'assorbanza a 280 nm), al fine di considerare la perdita di proteine durante le fasi di lavaggio, come suggerito nel manuale del kit.

La misurazione di sostanze acide-reattiva tiobarbiturico (TBARS) è un metodo utilizzato per rilevare la perossidazione lipidica. E' stato utilizzato un Kit TBARS test (Cayman Chemical, USA), che consente il rilevamento rapido fotometrico dell'addotto tiobarbiturico malondialdeide acido (TBAMDA) a 532 nm. Una curva di calibrazione lineare è stata calcolata da reazioni puri di malondialdeide.

TEST DI GENOTOSSICITA'

Comet test

L'elettroforesi su singola cellula (SCGE) o comet test, è un test di mutagenesi che permette di identificare danni al DNA di singole cellule. Questo test viene utilizzato per saggiare la capacità mutagena di sostanze chimiche o agenti fisici. Le cellule vengono poste su un vetrino portaoggetti preagarizzato e trattate con detergenti per lisare le membrane cellulari in modo che sul vetrino rimangano solo i nuclei che vengono sottoposti ad elettroforesi. Durante la corsa elettroforetica, i filamenti integri (di grosse

dimensioni) migrano scarsamente, mentre i frammenti derivati dai filamenti danneggiati migrano verso l'anodo in base al peso molecolare: più basso è quest'ultimo, maggiore sarà la distanza percorsa dal frammento durante la corsa. I frammenti migrano producendo una conformazione a "cometa" che risulta essere tanto più lunga quanto più è ingente il danno al DNA. Il DNA viene infine fatto legare da una sostanza fluorescente e viene così visualizzato tramite microscopio a fluorescenza.

Il Comet test viene generalmente effettuato a $pH > 13$ per rilevare, oltre alle rotture a singolo e a doppio filamento, i siti "alcalo-labili", cioè siti resi suscettibili alla rottura a valori elevati di pH a causa di distorsioni del filamento del DNA.

Effettuando il test a $pH = 12$ con l'utilizzo di enzimi (endonucleasi o Fpg) è possibile rilevare in modo specifico solo il danno ossidativo al DNA. Questi enzimi infatti riconoscono con elevata specificità le basi (purine e pirimidine) ossidate e a livello delle quali producono tagli nel filamento, valutabili col comet (Rojas E. 1999, Collins A. 2004). Invece il comet test a $pH = 8$ permette di individuare rotture dei doppi filamenti di DNA, evidenziando quindi un tipo di danno che è difficilmente riparabile e che può avere conseguenze diverse a livello cellulare (Olive P.L. 1992).

Protocollo Comet test $pH > 13$

Le cellule sono coltivate in piastrene 20 mm (corning) in terreno DMEM. Una volta raggiunta la confluenza, vengono trattate. Allo scadere del trattamento, si aspira il terreno, si lava ogni piastrina con 2 ml di PBS, lo si aspira, si staccano le cellule dalla superficie con 300 μ l di tripsina (Sigma), si centrifuga per 5 minuti a 2000 rpm e si valuta il numero di cellule nella sospensione col metodo del tripan blu. Un volume di cellule corrispondente a 2×10^4 /ml cellule viene risospeso in una soluzione di agarosio a basso punto di fusione (Low Melting Agarose, Sigma) allo 0.5% in PBS. Il volume totale di 'cellule+LMA' non deve superare i 200 μ l.

Si sgocciolano 85 μ l di questa soluzione con 'cellule+LMA' sul corrispondente vetrino da microscopia preagarizzato con agarosio (Agarose for routine use, Sigma) 1% in PBS. Si copre con vetrino coprioggetto e si incuba a 4°C per 10 minuti. Si toglie delicatamente il vetrino coprioggetto, si aggiungono altri 85 μ l di LMA e si incuba nuovamente a 4°C per 10 minuti, per favorire la formazione di un sandwich. Per ogni campione si preparano 2 vetrini, in modo che uno possa fungere da controllo per l'altro. Si prosegue con la fase di lisi, in cui i vetrini, privi del proprio coprioggetto, sono immersi, per 30' a 4°C, in

camerette porta vetrini contenenti la soluzione di lisi: 71 ml di soluzione stock (146.1 g/l NaCl, 37.2 g Na-EDTA/l, 1.2 g/l Tris-base, 8 g/l NaOH), 8 ml DMSO, (Fluka) e 0.8 ml Triton (Sigma).

Questo passaggio è fondamentale per lisare le membrane e liberare il nucleoide e permetterne la migrazione durante l'elettroforesi. Al termine della lisi, i vetrini sono lavati con soluzione di neutralizzazione (48.5 g/l Tris, pH 7.5). Si prosegue, dapprima con la stabilizzazione dei vetrini, per 30 minuti, in vasca elettroforetica, immersi in buffer di corsa (12 g/l NaOH, 0.372 g/l Na-EDTA, pH >13) per permettere lo srotolamento del DNA e poi con la corsa elettroforetica che è condotta a 20 V, 300 mA, per 40 minuti. Terminata la corsa, i vetrini sono estratti dalla vasca e sono lavati con 2 ml di soluzione di neutralizzazione che si lascia agire per 5 minuti, a temperatura ambiente; i vetrini si immergono, per 5 minuti a 4°C, in cameretta porta vetrini contenente etanolo (Fluka) per la fissazione. Si lasciano asciugare i vetrini overnight e li si colora con 500 µl di ioduro di propidio 20 µg/ml (Sigma). Segue l'analisi del danno al DNA al microscopio a fluorescenza (Axioplan), collegata ad una fotocamera che permette di fotografare in maniera random, almeno 50 cellule per ogni vetrino. In assenza di danno, il nucleo appare compatto e tondeggiante, al contrario, in presenza di rotture al DNA i gruppi fosfato dei nucleotidi, carichi negativamente, migrano verso l'anodo conferendo al materiale genetico la caratteristica forma di una cometa.

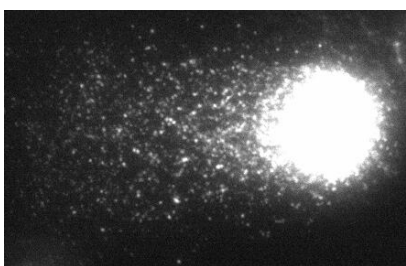
Si prosegue, poi, con la classificazione arbitraria delle cellule in A,B,C,D,E a seconda del tipo e dell'entità del danno seguendo i criteri in tabella (Tab.1).

Classificazione	Tipo di danno
A	Nucleo tondeggiante, intero, assenza di coda
B	Coda appena evidente
C	Coda evidente, nucleo ben distinto
D	Coda evidente, nucleo difficilmente distinguibile
E	Cellula completamente deteriorata, nucleo non distinguibile, ghost

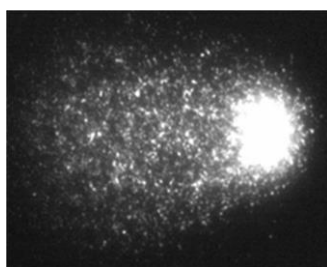
Tabella 1 Catalogazione arbitraria delle cellule esaminate al microscopio



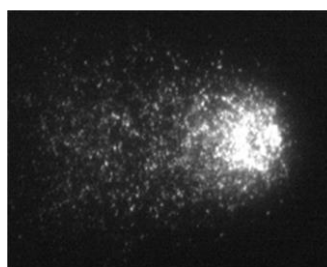
Cellule di tipo 'A'



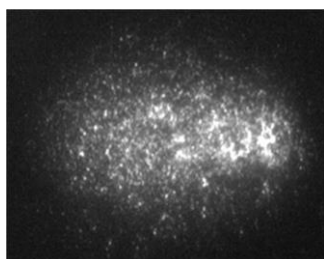
Cellule di tipo 'B'



Cellule di tipo 'C'



Cellule di tipo 'D'



Cellule di tipo 'E'

Comet test pH modificato (pH=12) con enzima endonucleasi III

Il comet test a pH modificato permette di evidenziare il danno al DNA indotto essenzialmente da stress ossidativo, grazie all'utilizzo dell'enzima endonucleasico specifico, endonucleasi III (ENDO III) purificato da *Escherichia Coli*. L'ENDO III riconosce le basi pirimidiniche ossidate. La procedura è identica a quella della comet alcalina pH>13 fino alla fase di lisi, eccetto che per il buffer di elettroforesi che deve essere portato a pH 12. Questo test prevede, infatti, prima dell'elettroforesi, incubazione con enzima (ENDO III o FPG) per 30 minuti, a 37°C. Anche in questo caso si preparano due vetrini per ogni campione: su uno si mettono 25 µl di enzima (ENDO III o FPG 1

µg/ml in buffer pH 7.5) e sull'altro 25 µl di buffer (0.1 M KCl, 0.5 mM Na-EDTA, 40 mM Hepes, 0.2 ml di FBS)

I valori devono essere valutati come Δ rispetto ai valori ottenuti senza enzimi.

WESTERN BLOT

Il western blot o immunofissazione o immunoblot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici; in generale, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni (o peso molecolare) utilizzando un gel di poliacrilammide. Successivamente le proteine vengono trasferite su di un supporto, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa, e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

Alla fine del trattamento con gliadina digerita le cellule sono state lavate con PBS, raccolte meccanicamente dalla Petri mediante una spatola (scraper) e omogenate. Viene così ottenuto un lisato contenente proteine, delle quali è necessario quantificare la concentrazione. Il dosaggio delle proteine è un procedimento relativamente semplice che permette di valutare la concentrazione delle proteine totali in una soluzione.

Individuata la concentrazione proteica dei singoli campioni, si procede alla preparazione delle mix per la corsa elettroforetica, una procedura che discrimina le proteine in base al loro peso molecolare.

Tutte le mix dovranno contenere:

- la stessa concentrazione di proteine,
- il “loading buffer”, che è utilizzato per facilitare il caricamento dei campioni e renderne possibile la visualizzazione a occhio nudo. Esistono vari tipi di loading buffer disponibili commercialmente. La composizione base è comunque TBE con 10-20% di Glicerolo (per facilitare il caricamento) e 4% di blu di bromofenolo (o altro colorante a basso peso molecolare).
- SDS al 4%, che si lega alle proteine, conferendo loro una carica netta negativa e rendendo insignificante la loro carica intrinseca.

A questo punto le mix vengono bollite, in modo da denaturare le proteine, spezzandone i ponti disolfuro intra e inter-catena tramite l'utilizzo di b-mercaptoetanololo, e lasciarne intatta solo la struttura primaria. Le proteine sono pronte per la corsa elettroforetica.

L'elettroforesi (SDS-PAGE) viene realizzata sovrapponendo due tipi di gel:

➤ Lo stacking gel (in alto): meno concentrato, presenta una struttura reticolare meno fitta del sottostante running, e permette anche il passaggio delle proteine più grandi. Ciò consente l'allineamento delle proteine, prima della corsa vera e propria, eliminando le conseguenze di una diversa concentrazione proteica nei campioni.

Lo stacking gel è composto da:

- ¹Spacer gel buffer 1,25 ml
- Acqua 7,5ml
- Acrilammide 1,25ml
- SDS 10% 100µl
- Temed 5µl
- ³APS 100µl

➤ Il running gel (in basso): più concentrato, è il vero mezzo attraverso il quale le proteine vengono risolte.

Il running gel all'8% è composto da:

- Acrilamide 6,6ml
- ²Running gel buffer 2,5ml
- Acqua 10,6ml
- SDS 10% 200µl
- Temed 5µl
- ³APS 100µl

¹Running gel buffer: 3 M tris HCl pH 8,9

²Spacer gel buffer: 0,5 M Tris PO₄ pH 6,7

³APS: NH₄ persolfato 10%

La percentuale di acrilammide determina la risoluzione della corsa. Quantitativi maggiori discriminano maggiormente le proteine a basso peso molecolare, essendo il reticolo delle fibre di acrilammide più fitto. Al contrario percentuali minori, discriminano maggiormente proteine con un peso molecolare maggiore.

Una volta preparato, il gel viene fissato all'interno di una camera per elettroforesi, riempita a dovere del tampone di corsa (“running buffer”)

RUNNING BUFFER	
TRIS	6g
GLICINA	28,8g
SDS	10mL
dH₂O	1L

A questo punto si passa al caricamento dei pozzetti e insieme ai campioni da esaminare viene caricato anche un marcatore di peso molecolare (MWM; molecular weight marker), una miscela di proteine dalla massa nota.

Conclusa la fase di caricamento si avvia la corsa per circa 1h 30' a 100V.

A corsa terminata, la camera viene svuotata, recuperando il tampone di corsa e smontata. Il gel è estratto dal supporto in vetro, ritagliato se necessario, e marcato con un segno che ne permette di identificare il verso di lettura. A questo punto può essere subito trasferito su supporto solido, tramite blotting.

Il blotting si basa sullo stesso principio fisico dell'elettroforesi. Le proteine, in questo caso, devono migrare dal gel a un supporto più resistente, quale una membrana di nitrocellulosa o di PVDF.

Preparato il sandwich costituito da: spugna-carta-gel-nitrocellulosa-carta-spugna (Figura 12), nell'apposita cassetta, esso viene sigillato, per permettere una perfetta adesione tra la nitrocellulosa e il gel, ed immerso, all'interno dell'apposita cassetta, nel blotting buffer. La cassetta deve essere mantenuta in ghiaccio e si avvia il blotting per 1h 30' a 100mV.

BLOTTING BUFFER	
TRIS	9g
GLICINA	43,2g
METANOLO	600ml
dH₂O	3L

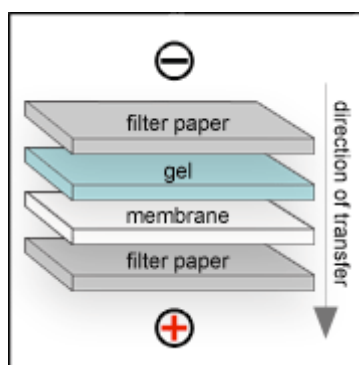


Figura 12 Ordine del sandwich per il blotting

Successivamente al blotting, la membrana viene incubata in 4% latte con PBS Tween 20 a temperatura ambiente per 1 ora in agitazione.

Infine la membrana viene incubata inizialmente con anticorpo primario specifico per la proteina da ricercare (transglutaminase 2 antibody, CUB7402 Life Technologies 1:500) over night a 4°C e successivamente un secondo anticorpo che individua gli anticorpi primari, amplificando il segnale (alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody (GE Healthcare) per 1 ora a temperature ambiente in agitazione.

Il legame di anticorpi e' stato rilevato mediante chemiluminescenza utilizzando ECL detection kit.

FRAZIONAMENTO CELLULARE

Il kit per il frazionamento cellulare consente la separazione graduale di citoplasma, membrane, parte solubile nucleare, cromatina e proteine del citoscheletro provenienti da colture cellulari di mammifero. Il primo reagente aggiunto al pellet provoca la permeabilizzazione delle membrane, rilasciando contenuti citoplasmatici solubili. Il secondo reagente dissolve i mitocondri, reticolo endoplasmatico e membrane del Golgi, ma non solubilizza le membrane nucleari. Dopo il recupero dei nuclei intatti per centrifugazione, un terzo reagente produce l'estratto nucleare solubile. Successivamente attraverso la nucleasi micrococcica si ha il recupero delle proteine della cromatina. Infine al pellet insolubile recuperato viene poi estratta con il reagente finale le proteine del citoscheletro.

Le cellule sono state seminate in petri da 60mm (Euroclone), dopo aver raggiunto l'80% di confluenza le cellule sono state trattate con gliadina digerita (250ug/mL to 1000µg/mL).

Dopo 24 ore di incubazione le cellule sono state lavate con PBS, trpsinizzate e centrifugate. Dopo la formazione del pellet si procede seguendo le istruzioni del kit (Thermo Scientific 78840).

ATTIVITA' DELLA TRASGLUTAMINASI 2

L'analisi dell'attività dell'enzima in differenti compartimenti cellulari è stato effettuato utilizzando un kit Transglutaminase Colorimetric Micro-assay kit (opr0001, ABCAM).

Per questo esperimento sono stati utilizzati i campioni precedentemente preparati nel frazionamento.

IMMUNOFLUORESCENZA: γ-H2AX

L'immunofluorescenza è una delle tecniche più usate in biologia cellulare, immunologia o nei laboratori biomedici, per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni, utilizzando anticorpi legati a traccianti fluorescenti. Gli anticorpi sono in grado di legarsi alle strutture cellulari in modo molto specifico, consentendo la valutazione quantitativa e qualitativa delle strutture bersaglio attraverso un microscopio a fluorescenza. L'immunofluorescenza è una tecnica vantaggiosa poichè consente una buona sensibilità e specificità di reazione, semplicità e rapidità di esecuzione, facile riproducibilità e permette di indagare contemporaneamente la presenza di più anticorpi rivolti contro antigeni distinti.

Esistono due principali tipi di immunofluorescenza: diretta e indiretta.

Nell'immunofluorescenza diretta si incuba il substrato con un anticorpo primario marcato con un fluorocromo: l'anticorpo riconosce l'antigene e lo lega specificamente.

L'immunofluorescenza indiretta invece, prevede due fasi: inizialmente un anticorpo non marcato (primario) viene incubato con il suo substrato e si lega all'antigene formando il complesso antigene-anticorpo. Successivamente viene aggiunto al sistema un anticorpo secondario, marcato con un fluorocromo e specifico contro il primo anticorpo. Più anticorpi secondari si legano al complesso antigene anticorpo-primario, rivelando

attraverso il fluorocromo coniugato la presenza dell'antigene e amplificando la fluorescenza.

Nell'esperimento in questione è stata utilizzata l'immunofluorescenza con marcatura indiretta.

La tecnica è stata utilizzata per visualizzare la presenza di fosforilazione dell'istone H2AX a livello della serina 139. Questo evento è considerato un marker molto specifico di rotture al doppio filamento di DNA (DSB) (Rogakou E.P. 1998).

In seguito alla formazione di lesioni al DNA, le diverse proteine coinvolte nella riparazione interagiscono con le proteine della cromatina, come l'istone H2AX. Successivamente a questa interazione, si ha un rimodellamento della cromatina che permette l'accesso al sito danneggiato e la riparazione della lesione in maniera regolata nel tempo. Negli eucarioti, la riparazione per ricombinazione è regolata da complessi multiproteici che sono organizzati in foci nel sito della lesione.

Procedura

Le cellule, che crescono in adesione, sono state seminate in petri da 60mm dove precedentemente è stato posto un vetrino coprioggetto sterilizzato con etanolo. Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state lavate con PBS e fissate con metanolo freddo (-20°C) per 10 minuti a temperatura ambiente. Al fissaggio seguono due lavaggi in PBS per 5 minuti dopo i quali le cellule sono state permeabilizzate per favorire il successivo ingresso degli anticorpi con una soluzione di Triton X-100 0.5% in PBS (Sigma-Aldrich) per 20 minuti a temperatura ambiente. In seguito sono stati effettuati tre ulteriori lavaggi da 5 minuti ognuno in PBS 1x in modo da eliminare completamente la soluzione di permeabilizzazione. Al termine dei lavaggi sono stati bloccati i siti aspecifici con albumina di siero bovino (Sigma-Aldrich) 3% in PBS 1x per 30 minuti a temperatura ambiente. Durante il blocco dei siti aspecifici si prepara una camera umida nella quale verranno posti i campioni per l'incubazione con gli anticorpi. L'anticorpo primario utilizzato è un Anti-fosfo-istone H2AX (Ser 139) monoclonale prodotto in topo (1mg/mL, Millipore), è stato diluito 1:150 in BSA 1% (in PBS 1x) e lasciato incubare con i campioni per 2 ore a temperatura ambiente.

Al termine dell'incubazione sono stati effettuati tre lavaggi con PBS 1x da 5 minuti ciascuno e i campioni sono stati poi incubati per 1 ora con l'anticorpo secondario (1:500 in

BSA 1%), un Goat AntiMouse IgG (H+L) (2mg/mL, Life Technologies TM) a cui è legato il fluorocromo Alexa Fluor [®] 488. Infine i campioni vengono sottoposti a tre lavaggi in PBS 1x per 5 minuti e uno in H₂O dopo i quali vengono montati sul vetrino portaoggetti con l'aiuto di un montante (Vectashield[®] Mounting Medium with DAPI, VECTOR) e conservati a 4°C fino al momento della lettura al microscopio.

L'analisi dei foci dell'istone γ -H2AX si osserva al microscopio a fluorescenza facendo uso dell'obiettivo 60x (Nikon Eclipse E600) in combinazione con una fotocamera digitale. Per ogni punto sperimentale sono state analizzate 100 cellule.

Le immagini acquisite sono state analizzate col programma ImageJ attraverso cui le cellule sono state inserite in una delle tre diverse fasce di danno in base al numero di foci visualizzati per ogni cellula.

Le cellule positive sono state divise in diverse classi in base al numero di foci γ -H2AX presenti (0-5 foci/nucleo, da 6 a 10 foci/nucleo e oltre 10 foci/ nucleo); le cellule che non presentavano foci γ -H2AX sono state riportate come negative (Figura 13).

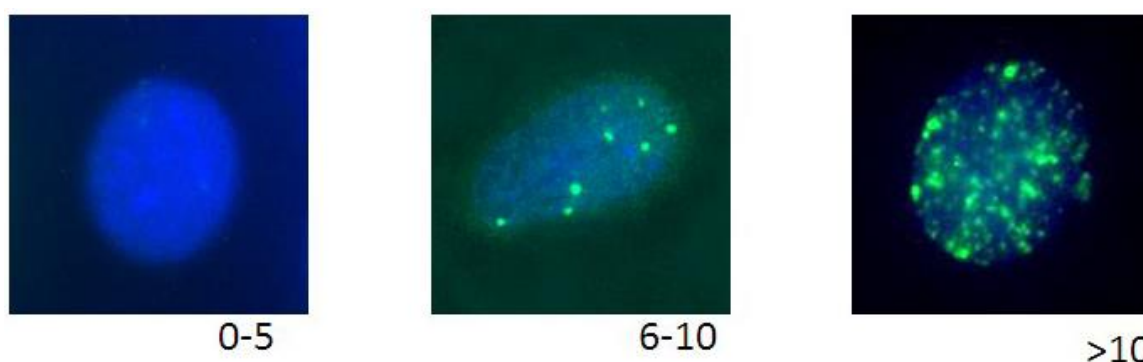


Figura 13 Esempi di cellule, in base alla categoria. I puntini verdi corrispondono ai foci. È stato effettuato il merging delle immagini tramite ImageJ per facilitare il conteggio dei foci

TEST PER LA VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

L'apoptosi viene valutata con il Test dell'Annexina V che permette di evidenziare le cellule apoptotiche, mediante il marcatore fosfolipide fosfatidilserina (PS). Nelle cellule vive, il fosfolipide fosfatidilserina (PS) è localizzata sul lato citoplasmatico della membrana. Nelle cellule apoptotiche, invece, la PS è traslocata all'esterno della membrana, esponendo la PS nell'ambiente extracellulare.

L'annessina V (anticoagulante umano) è una proteina di 35-36 KDa, Ca^{2+} dipendente, con elevata affinità per i fosfolipidi, in particolare per la PS, poichè è legata ad un fluoroforo in grado di marcare cellule apoptotiche, emettendo fluorescenza.

È stato utilizzato un kit (Vybrant Apoptosis Assay Kit, Invitrogen). Le cellule sono coltivate in piastre 20mm (Corning), in terreno DMEM. Raggiunto l'80% di confluenza le cellule vengono trattate con la solita modalità. Successivamente vengono lavate con PBS, staccate dalla superficie della piastra con 300 µl di tripsina (Sigma), riprese in 1 ml di PBS+FBS 0,5%, centrifugate per 10 minuti a 1000 rpm e contate con metodo del tripan blu per avere 1×10^6 cellule per ml. Si aspira il surnatante e si risospende il pellet in 100 µl di Annexin Binding Buffer (ABB) diluito 1:10 in Na-citrato 0.1% (è stato utilizzato un buffer diverso da quello fornito dal kit perché risultato troppo tossico per le nostre cellule). Nei vari campioni si aggiungono 2,5 µl di annessina V e 1 µl di working solution (propidio ioduro 1:10 in ABB 1:10 in Na-citrato 0.1%) seguendo il seguente schema e incubando per 15 minuti al riparo dalla luce:

	Annessina V	Working solution
Controllo negativo	NO	NO
Controllo negativo	NO	SI'
Controllo negativo	SI'	NO
Controllo negativo	SI	SI
Campioni trattati	SI	SI

Terminata l'incubazione si aggiungono 400 µl di ABB 1:10 in Na-citrato 0.1%. Si procede con la lettura al citofluorimetro (FACScalibur Becton Dickinson) alla lunghezza d'onda di eccitazione di 496 nm e di emissione di 519 nm.

PAZIENTI

Prelievo di biopsia per analisi immunoistochimica

Sono stati analizzati 5 pazienti con malattia celiaca attiva (prima diagnosi) e 5 pazienti non celiaci utilizzati come controllo, con una normale mucosa duodenale e con sierologia negativa. I pazienti sono stati arruolati dal Centro per la Prevenzione e Diagnosi della

malattia celiaca della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico (Milano) tra il 2013 e il 2014. Per l'analisi di immunoistochimica sono state utilizzate delle sezioni preparate in paraffina.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico della Fondazione IRCCS Ca' Granda.

Prelievo di siero per analisi stress ossidativo

I pazienti arruolati erano prevalentemente donne (64,7%), e non fumatori, con un range di età di 22-73 anni. Un totale di 34 soggetti sono stati inclusi nello studio e diviso nei seguenti gruppi:

- a) 10 soggetti sani, CTRL;
- b) 10 pazienti celiaci naive, NCD;
- c) 10 pazienti celiaci, sottoposti a dieta priva di glutine per almeno 12 mesi, CD-GDF;
- d) 4 celiaci refrattari, pazienti non responders, sottoposti a dieta priva di glutine per almeno 12 mesi, RCD. I pazienti RCD inclusi nello studio sono stati sottoposti a dieta priva di glutine e a terapia farmacologica (ad esempio inibitori di pompa protonica).

La diagnosi di malattia celiaca è basata sull'analisi sierologica di anticorpi specifici: anti-TG2 IgA e / o anti-endomisio IgA e almeno un Marsh-Oberhuber di III grado istologico duodenale.

Il gruppo CTRL è composto da soggetti sierologicamente negativi senza lesioni endoscopiche e istologiche e assenza di altre malattie autoimmuni o intestinali.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DI SIERO

Tutti i soggetti arruolati sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso; i campioni sono stati raccolti in provette vacutainer e centrifugate a 1000x g per 10 minuti a 4° C (5702R, Eppendorf, Germania). Il plasma ottenuto è stato aliquotato e conservato a -80°C fino all'analisi.

ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

L'immunoreattività delle biopsie duodenali per l'istone fosforilato H2AX Ser139 (γ -H2AX, Abcam, Cambridge, UK), o 8 Hydroxyguanosine (8HG, clone N45.1, Abcam, Cambridge, UK) sono stati analizzati al fine di valutare il danno al DNA mediante immunoistochimica.

L'immunoistochimica è stata effettuata utilizzando il sistema automatico di ULTRA benchmark (Ventana Medical Systems) e le reazioni sono state rivelate utilizzando il UltraView universale DAB, (Ventana Medical Systems). Immunoreattività per γ -H2AX e 8HG è stato valutato come la percentuale di cellule positive rispetto al numero totale di cellule separatamente sia per la mucosa duodenale che per i linfociti intraepiteliali (IELS).

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando il software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. California, USA). Per l'analisi dei risultati degli esperimenti sono stati utilizzati diversi test statistici, a seconda del tipo e della numerosità dei campioni, quali Anova test. Le differenze sono considerate significative quando $p < 0.05$.

RISULTATI

CITOTOSSICITA'

La valutazione *in vitro* dell'effetto citotossico della gliadina digerita è stata effettuata utilizzando il test dell'MTT. Questo test si basa sulla riduzione, da parte dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) in sali di formazano che sono indicativi del numero di cellule vive e metabolicamente attive.

I valori vengono espressi come percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo a cui si attribuisce il 100% di vitalità.

L'MTT test è stato utilizzato per individuare le concentrazioni di gliadina digerita non citotossiche, e quindi correttamente utilizzabili nei test di genotossicità. Affinché una concentrazione possa essere ritenuta valida non si deve avere una riduzione della vitalità superiore al 50%.

Le cellule Caco-2 sono state trattate per 24h con gliadina digerita a diverse concentrazioni (250µg/mL a 1000µg/mL). I nostri dati non dimostrano una diminuzione della vitalità cellulare statisticamente significativa, anche se alla dose di 1000µg/mL si evidenzia una riduzione della percentuale di cellule vitali pari al 30% (Figura 14).

In base a questo risultato tutte le dosi sono state utilizzate negli esperimenti.

VALUTAZIONE DELLA QUANTITA' DI ROS INTRACELLULARE

La formazione di ROS è stata misurata tramite la lettura della fluorescenza emessa dalla sonda 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) in seguito alla reazione con le specie reattive dell'ossigeno presenti in cellula. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico ed espressi come percentuale rispetto al controllo negativo al quale viene attribuita una percentuale di produzione di ROS del 100%.

Nei nostri esperimenti le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni di gliadina digerita (250 µg/mL a 1000 µg/mL) e a tre diversi tempi di esposizione (6h, 12h e 24h).

I nostri risultati dimostrano un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno dopo l'esposizione a differenti concentrazioni e tempi.

Infatti dopo 12h di trattamento con gliadina digerita si verifica un aumento significativo della produzione di ROS alle concentrazioni di 500µg/mL ($p<0.01$) e 1000µg/mL ($p<0.001$)

L'aumento della produzione di ROS viene mantenuta anche dopo 24h di trattamento, ma solo alla concentrazione di 1000µg/mL ($p<0,05$) (Figura 15).

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI CELIACI

La valutazione dello stress ossidativo è stata valutata mediante un test immunoenzimatico utilizzando campioni di siero di pazienti celiaci prima diagnosi, pazienti celiaci a dieta, pazienti non responsivi alla dieta e pazienti controllo che non presentano nessuna malattia auto-immune o infiammatoria.

Sono stati valutati i principali marcatori di stress ossidativo come la TBARS che è un marker di perossidazione lipidica, la concentrazione di proteine carboniliche e la capacità antiossidante totale.

Per quanto riguarda la TAC (capacità antiossidante totale) i nostri risultati hanno evidenziato una significativa diminuzione nei pazienti non responsivi alla dieta (RCD) ($p<0,001$), nei pazienti celiaci prima diagnosi (nCD) ($p<0,01$) e nei pazienti celiaci a dieta (CD-GFD) ($p<0,05$). I risultati sono stati valutati rispetto al controllo (CTRL).

Le concentrazioni plasmatiche di TBARS, valutati come marker della perossidazione lipidica e le proteine carboniliche (PC), valutati come marker di ossidazione delle proteine, sono stati trovati significativamente aumentati nei pazienti RCD ($p<0,01$) e nei pazienti celiaci prima diagnosi ($p<0,01$).

Mentre per quanto riguarda i livelli plasmatici di CD-GDF sono risultati simili al CTRL in entrambi i biomarcatori plasmatici (Proteine carboniliche e TBARS) (Figura 16).

Il gruppo dei pazienti non responsivi alla dieta da noi studiato era composto solo da 4 pazienti. Si tratta comunque di una patologia rara e che pur essendo un numero esiguo può essere di utilità prospettica per impostare nuovi studi.

COMET TEST ALCALINO (pH>13)

Il test del Comet alcalino consente di misurare il danno al DNA in singole cellule, dopo 24 ore dal trattamento, come rotture al singolo ed al doppio filamento. Il danno è stato misurato classificando i singoli nucleoidi in base alla morfologia che assumono (A, B, C, D, E) in seguito a corsa elettroforetica. La classificazione dei nucleoidi è espressa come percentuale sul totale dei nucleoidi analizzati. Un'ulteriore quantificazione del danno è stata fatta tramite un programma di elaborazione dell'immagine che fornisce parametri quali la lunghezza della coda (tail length, μm), la percentuale di DNA nella coda (%DNA) ed il tail moment (μm), che è il prodotto dei due parametri precedenti. L'incremento di questi tre parametri rispetto al controllo negativo è indice di danno.

Le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni di gliadina digerita (da 250 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$) per 24h.

Il trattamento con gliadina ha evidenziato un aumento dei valori di Tail Length, %DNA e Tail Moment in modo significativo. Per quanto riguarda il Tail length è risultato significativo alle dosi 250 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,05$) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.001$). Per il % di DNA nella coda si evidenzia un aumento significativo alla concentrazione di 500 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.05$) e alla 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.001$). Anche il Tail Moment aumenta in modo significativo, ma solo alla dose massima, 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.001$) (Figura 17).

Per quanto riguarda la valutazione mediante classificazione dei nucleoidi ha dimostrato una diminuzione delle cellule (A) partendo dalla dose di 250 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.001$) e un aumento delle cellule (E) in maniera dose dipendente alle concentrazioni 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.05$) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.01$). Mentre per quanto riguarda le cellule di tipo (B, C, D) si evidenzia un aumento del danno partendo dalla concentrazione di 250 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.01$) (Figura 18).

COMET TEST pH MODIFICATO (pH=12)

Con il comet test a pH modificato abbiamo voluto verificare se il danno al DNA evidenziato con comet alcalino fosse di tipo ossidativo. Abbiamo utilizzato come marcatore l'enzima endonuclease III, il quale è in grado di riconoscere le basi pirimidiniche ossidate.

Infatti dopo 24h di trattamento con gliadina digerita abbiamo evidenziato un aumento del danno al DNA caratterizzato da un aumento della lunghezza della coda. È quindi possibile notare che alla concentrazione di 1000 $\mu\text{g/mL}$ si ha un aumento del Δ tail moment ($p < 0.01$) rispetto al controllo (Figura 19).

TEST DELL'ISTONE H2AX FOSFORILATO (γ H2AX)

L'analisi del danno viene effettuata classificando ciascuna cellula in una fascia di danno: cellule che presentano da 0 a 5 foci (assenza di danno), cellule che presentano da 6 a 10 foci (danno intermedio) ed infine cellule con più di 10 foci (danno esteso). I risultati sono espressi come percentuale di cellule in ciascuna fascia.

Dopo il trattamento con gliadina alle diverse concentrazioni (da 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$) si evidenzia un aumento statisticamente significativo di rotture al doppio filamento di DNA rispetto al controllo.

L'aumento dei DSBs è stato riscontrato attraverso un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) della percentuale di cellule con più di 10 foci sia alla concentrazione di 500 $\mu\text{g/mL}$ che 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 20).

ATTIVITA' DELLA TRANSGLUTAMINASI 2

Elisa test

Attraverso questo test abbiamo voluto valutare l'attività della Transglutaminasi 2 in differenti compartimenti cellulari. È stato effettuato tramite un test immunoenzimatico (Elisa test) che permette di valutare la presenza dell'enzima attraverso l'utilizzo di specifici anticorpi.

Le cellule inizialmente sono state trattate con gliadina digerita a differenti concentrazioni (da 250 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$) e successivamente mediante un kit specifico sono stati estratti i singoli compartimenti.

A questo punto sono stati utilizzati questi campioni per la valutazione dell'attività dell'enzima.

I nostri risultati dimostrano un aumento dell'attività dell'enzima nel citoscheletro a tutte le dosi: $p < 0.5$ per 1.000 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$ per 500 $\mu\text{g/mL}$ e $p < 0.001$ per 250 $\mu\text{g/mL}$. A livello della

cromatina la Transglutaminasi risulta aumentata alla dose di 1.000µg/ml ($p<0.5$) (Figura 21)

Western blot

Attraverso il western blot abbiamo voluto verificare l'espressione della Transglutaminasi 2 in cellula dopo il trattamento con gliadina digerita.

Dopo il trattamento con gliadina digerita alle differenti concentrazioni (500 e 1000µg/mL), le cellule sono state omogenate e le varie proteine presenti sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide.

Sono stati valutati campioni di omogenato proteico di 30 e 40 µg, da cui è stata ottenuta l'intensità relativa, normalizzata rispetto all'actina, il tutto in percentuale rispetto al controllo.

I nostri dati evidenziano un aumento statisticamente significativo ($p<0,01$) dell'espressione della Transglutaminasi 2 solo alla dose di 1000µg/mL (Figura 22).

APOPTOSI

Questo test sfrutta la capacità della proteina annessina V di legare la fosfatidilserina (PS), un fosfolipide che viene traslocato all'esterno della membrana durante il processo apoptotico. I valori riportati in grafico sono espressi come percentuale di cellule apoptotiche presenti nel campione.

L'aumento di cellule apoptotiche nella linea cellulare Caco-2 risulta essere significativo già alla dose di 250 µg/mL. Infatti dopo 24h di trattamento con gliadina digerita si evidenzia un aumento di cellule apoptotiche del 75% alla dose di 250µg/mL ($p<0,01$). Mentre alla dose di 1000µg/mL si ha una diminuzione delle cellule vitali dell'80% ($p<0,001$). I nostri risultati sono stati comparati con il controllo (cellule non trattate) (Figura 23).

DANNO AL DNA IN VIVO

La valutazione del danno al DNA è stato effettuato su biopsie duodenali di pazienti celiaci considerati prima diagnosi, cioè non ancora sottoposti a dieta senza glutine.

I nostri risultati mostrano un significativo aumento di immunopositività all'H2AX fosforilato ($p<0,01$) nei linfociti intraepiteliali di pazienti celiaci rispetto al controllo (Figura 24).

Per quanto riguarda invece l'immunopositività del 8-OHdG si evidenzia un significativo aumento a livello sia della mucosa duodenale che nei linfociti intraepiteliali ($p<0,001$) (Figura 25). I nostri risultati sono stati comparati a soggetti sani.

La statistica è stata effettuata su 10 valori per ogni singolo gruppo in quanto ogni paziente è stato letto due volte in cieco da due patologi diversi.

DISCUSSIONE

In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio, detto ossido-riduttivo, tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e il sistema di difesa antiossidante che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto.

Tutte le forme di vita conservano, all'interno delle loro cellule, un ambiente riducente che viene preservato da enzimi che mantengono lo stato ridotto attraverso un costante apporto di energia metabolica. Disturbi del normale stato redox possono provocare effetti tossici attraverso la produzione di specie chimiche reattive che danneggiano le componenti della cellula incluse proteine, lipidi e acidi nucleici (Davies K.J. 1987).

I ROS e altre specie reattive vengono continuamente prodotte dal nostro organismo attraverso numerosi processi biochimici. Determinate quantità di sostanze ossidanti sono infatti indispensabili per mantenere il corretto funzionamento cellulare, regolando i meccanismi propri dell'omeostasi (Iorio E.L. 2007).

Durante le reazioni di riduzione dell'ossigeno, però, le specie reattive generate possono superare il valore soglia fisiologico. Se tali molecole non vengono neutralizzate dai sistemi antiossidanti, si possono instaurare danni all'interno della cellula, in grado di condurre la stessa ad apoptosi (Dean R.T. 1993).

Quindi, se si genera uno sbilanciamento tra la produzione di ROS e l'efficacia del sistema di difesa antiossidante, si stabilisce una condizione di stress ossidativo.

Lo stress ossidativo gioca un ruolo importante nello sviluppo di numerose patologie croniche, quali disturbi cardio-circolatori (aterosclerosi, ischemie, ictus), diabete, cancro, malattie neurodegenerative e invecchiamento cellulare. Inoltre sembra essere coinvolto nello sviluppo della malattia celiaca e disturbi gastrointestinali (Halliwell B. 1994, Grisham M.B. 1994).

Esistono diversi studi che dimostrano come la gliadina sia in grado di alterare lo stato ossido riduttivo cellulare e provocare quindi una situazione di stress ossidativo.

Diversi studi *in vitro* hanno riportato effetti pro-ossidativi della gliadina in colture di cellule intestinali umane. Infatti hanno dimostrato che l'effetto antiproliferativo di gliadina è associata a cambiamenti pro-ossidativi, come il livello LOOH elevati, riduzione del

livello di GSH e progressiva scomparsa dei gruppi sulfidrilici nelle proteine (Elli L. 2003, Rivabene R. 1999, Dolfini E. 2005, Dolfini E. 2002).

Questo evento è capace di innescare una serie di modifiche nella struttura e funzione della membrana che, a loro volta, possono influenzare i pathway di trasduzione del segnale coinvolti nel controllo del ciclo cellulare.

Inoltre i peptidi gliadini sono in grado di portare ad un aumento di 4-idrossi-nonenale (4-HNE), prodotto della perossidazione lipidica, con conseguente cambiamenti sia di fluidità di membrana che di permeabilità (Rivabene R. 1999).

Gli effetti pro-ossidanti della gliadina sono stati segnalati anche in pazienti celiaci.

Questi processi pro-ossidanti possono causare ulteriori danni alla mucosa intestinale attraverso la formazione di radicali liberi e idroperossidi lipidici (LOOH), che può avere effetti di vasta portata sulla omeostasi metabolica intestinale (Rivabene R. 1999)

È stato dimostrato che la xantina-ossidasi (XO) è attivata in enterociti di pazienti celiaci, portando alla sovrapproduzione di radicali liberi e ROS. Il sistema xantina ossidoreduttasi si trova principalmente nella mucosa intestinale e nel fegato (Sarnesto A. 1996). La distribuzione di questo enzima non è uniforme. Studi istologici hanno dimostrato che la parte principale del XO si trova nelle cellule epiteliali in cima ai villi intestinali, mentre nessuna attività di XO è stata rilevata alla base delle cripte (Pickett J.P. 1970). I risultati di Boda e colleghi (1999) suggeriscono che in pazienti con malattia celiaca attiva, insieme con la risultante infiammazione, provoca l'attivazione di XO negli enterociti, che si traduce in sovrapproduzione di ROS e ulteriori danni alla mucosa (Boda M. 1999).

Inoltre in uno studio precedente sono stati trovati alti livelli di LOOH nella mucosa di pazienti celiaci con malattia celiaca attiva e anche in pazienti a dieta, mentre a livello del plasma LOOH è risultato elevato solo in pazienti con celiachia attiva (Stojiljkovic V. 2012).

Questi processi pro-ossidanti sono contrastati dalla presenza di enzimi antiossidanti endogeni (Superossido dismutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutathione perossidasi (GPx)).

Diversi studi dimostrano che l'attività antiossidante nei pazienti celiaci è notevolmente ridotta. Infatti, il ciclo redox GSH è il principale meccanismo di disintossicazione di LOOH a livello intestinale (AW T.Y. 2005). Nei pazienti celiaci è stata evidenziata una riduzione significativa della concentrazione di GSH nella mucosa intestinale sia nei pazienti celiaci con la forma attiva che nei pazienti con regime a dieta priva di glutine paragonati ai soggetti controllo (Stojiljkovic V. 2012).

La deplezione di GSH è correlata a una diminuzione delle attività di GPx e GR, infatti è stata rilevata in biopsie e eritrociti prelevati da pazienti celiaci con grave atrofia dei villi una diminuzione di GPx (Stahlberg M.R. 1988) (Stahlberg M.R. 1991). Esistono altri enzimi antiossidanti coinvolti per contrastare il processo pro-ossidante: MnSOD e CuZnSOD. L'attività di MnSOD in uno specifico studio è stato trovato elevato in pazienti con atrofia dei villi confronto al gruppo Marsh 0, mentre l'attività CuZnSOD non sembra variare in modo significativo. Tuttavia, le correlazioni tra le attività delle due SOD e il grado di lesione mucosale indicano che più grave è il danno mucosale più si evidenzia un aumento delle attività enzimatiche. Questo può rappresentare una risposta fisiologica ad un più alto tasso di produzione di ROS. Al contrario, l'attività di catalasi (CAT) non varia significativamente tra i gruppi analizzati. Questo potrebbe essere una conseguenza delle caratteristiche cinetiche di questo enzima, poiché la CAT è più efficace contro alte concentrazioni di H_2O_2 . Quindi, quando le concentrazioni di H_2O_2 sono più basse, una protezione più efficace è dato dal GPx. Dal momento che l'attività di GPx, nel tessuto gastro-intestinale è significativamente ridotta nei pazienti con atrofia dei villi (Marsh 3a e 3b Marsh), lo squilibrio tra la produzione di H_2O_2 e scavenging provoca uno spostamento proossidante, che si traduce in un aumento di lipoperossidazione e concentrazione di LOOH (Stojiljkovic V. 2012).

L'aumento dei livelli LOOH può contribuire alla distruzione di percorsi disintossicanti nel tratto intestinale e alla disfunzione degli enterociti, che può causare vari disturbi dell'apparato digestivo (Aw T.Y. 1998). L'intestino differisce da altri organi per avere un elevato rimodellamento cellulare, la durata di enterociti è solo 4-6 giorni (Iatropoulos 1986). A causa del tasso di divisione cellulare elevata, la possibilità di diffondere una mutazione alla cellula alle generazioni successiva è molto superiore rispetto a quelle cellule con un tasso di divisione basso, il che rende l'intestino molto sensibile alla mutagenesi e cancerogenesi. E' stato dimostrato che le alte concentrazioni di LOOH possono portare all'attivazione di processi pro-apoptotici (Imai H. 2003).

Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che l'esposizione di cellule intestinali umane ad alte concentrazioni di LOOH può indurre la transizione delle cellule da riposo a uno stato proliferativo o addirittura a un arresto di crescita alterando l'omeostasi intestinale (Gotoh 2002, Wang T.G. 2000). Inoltre, LOOH causa danni alle membrane delle cellule intestinali, rotture del DNA a singolo e doppio filamento e influenzare l'attività degli enzimi antiossidanti (Wijeratne S.S. 2006).

Di tutti i parametri che descrivono il danno ossidativo al DNA il più importante è l'analisi di 8-oxo-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG), perché può informare un carico di modifica del DNA potenzialmente mutageno e il livello di 8-oxodG nel DNA cellulare rappresenta un delicato equilibrio tra formazione e la rimozione di basi danneggiate.

Al momento esiste un unico studio riguardante il danno al DNA nella malattia celiaca (Logan R.F.A. 2009), in cui sono stati analizzati i livelli dell'8-oxodG nei leucociti e nelle urine di pazienti celiaci.

Sorprendentemente in questo studio entrambi i marcatori di danno ossidativo al DNA erano più alti nei pazienti con malattia celiaca in confronto ai controlli, indipendentemente dalla dieta (anche se tutti i parametri che descrivono il danno erano leggermente superiori nel gruppo non trattato rispetto al gruppo trattato (GFD)).

L'aumento dei livelli di 8-oxodG in tutti i gruppi di pazienti può essere il risultato di una carenza dei meccanismi di riparo del danno al DNA. È interessante notare che i pazienti con malattia celiaca hanno una maggior probabilità di sviluppare cancro proprio per la presenza di un difetto nei meccanismi di riparo (Freeman H.J. 2009).

Altro fenomeno importante presente nella malattia celiaca è l'apoptosi. Questo fenomeno è essenziale per il mantenimento delle funzioni epiteliali dell'intestino in quanto è coinvolto nel turnover degli enterociti normali. In condizioni fisiologiche le cellule apoptotiche sono limitate alle punte dei villi nel piccolo intestino e sono sostituite da un numero uguale di cellule proliferanti immature (Watson A.J. 1995). Al contrario, nei disturbi immuno-mediati come malattie infiammatorie intestinali o malattia celiaca (CD), si verifica un aumento del numero di apoptosi precoce degli enterociti lungo l'asse dei villi (Iwamoto M. 1996). La combinazione di aumentata apoptosi e tassi di turnover alterati porta a cambiamenti architetturici nella mucosa, caratterizzata da atrofia dei villi e iperplasia delle cripte (Moss S.F. 1996).

Come regola generale, l'apoptosi è stato descritto come un processo mediato da due percorsi che, anche se strettamente intrecciate, rappresentano modi differenti per raggiungere lo stesso risultato, cioè la morte di una cellula. Un percorso (mediato dai recettori) coinvolge principalmente l'attivazione della caspasi-8 attraverso la via estrinseca; l'altro ha dimostrato di essere legato principalmente alle modifiche mitocondriale e attivazione di caspasi-9, con rilascio del citocromo C nel citoplasma e formazione del complesso apoptosoma (via intrinseca). Entrambe le caspasi attivano infine

la caspasi-3 per scissione proteolitica, la quale dà il via al processo apoptotico (Hengartner M.O. 2000).

Diversi studi condotti in cellule Caco-2 e utilizzando degli specifici inibitori delle caspasi hanno portato ad ipotizzare che l'apoptosi indotta da peptidi gliadinici sembra essere mediata dal meccanismo Fas/ Fas ligand e sotto il controllo della caspasi 8 (Giovannini C. 2003). Infatti dopo l'esposizione con peptidi gliadinici l'espressione del recettore Fas aumenta significativamente come anche il suo ligando FasL anche se in misura minore.

L'ipotesi di un'attivazione di un meccanismo estrinseco mediato da gliadina che porta alla degenerazione delle cellule può essere considerato anche attraverso esperimenti *in vivo*. Infatti uno studio condotto da Ciccocioppo et al. dimostra che nella mucosa di pazienti celiaci risulta una sovraespressione dei recettori Fas sugli enterociti e del suo ligando FasL sui linfociti della mucosa (Ciccocioppo R. 2001).

Il processo apoptotico sembra essere correlato anche all'attivazione della Transglutaminasi 2

L'accumulo di ROS intracellulare ha una serie di conseguenze, diretti e indiretti, sulle vie di segnalazione cellulare e può interferire con l'espressione genica che porta a cambiamenti nella modificazione post-traduzionale di proteine. Dati di letteratura indicano una forte associazione tra stress ossidativo e TG2 up-regulation. La Transglutaminasi 2, è un enzima multifunzionale calcio-dipendente, è stata identificata in una varietà di eventi fisiologici, quali la differenziazione cellulare, la trasduzione del segnale, apoptosi e stress ossidativo. Questo enzima è localizzato in più compartimenti cellulari, tra cui il nucleo, citoplasma, mitocondri, membrana plasmatica, superficie delle cellule e matrice extracellulare. E' in grado di interagire con un sottoinsieme distinto di proteine e / o substrati ed esegue compiti diversi a seconda della sua posizione subcellulare (Ientile R. 2007, Elli L. 2009). L'attivazione intracellulare di TG2, è principalmente quiescente tranne durante le condizioni di stress estremi, dipendenti dai livelli di afflusso di calcio $[Ca^{2+}]$ intracellulare. Quando vari stimoli portano ad un aumento citosolico di $[Ca^{2+}]$ sopra di una certa soglia, l'attività di transamidazione della TG2 non è più inibita dal GTP e facilita i processi di morte cellulare (Nurminskaya M.V., 2012, Caccamo D. 2012).

Diversi dati suggeriscono una forte associazione tra stress ossidativo e TG2 up-regulation. Quest'ultimo a sua volta può causare sopravvivenza cellulare o apoptosi, a seconda del tipo di cellula, il tipo di stress e la durata dell'evento. In particolare, la TG2 sembra essere

protettivo contro la morte delle cellule quando i fattori di stress che vengono utilizzati non danno luogo ad un aumento dell'attività di transaminazione (Caccamo D. 2012).

Quindi la TG2 può avere più di un ruolo nella cascata di eventi che portano alla morte della cellula. Nelle prime fasi del fenomeno, l'enzima svolge una funzione regolatoria, indirizzando la cellula o verso la morte o verso la sopravvivenza, mediante l'interazione con altre proteine (es. proteina del retinoblastoma). Nelle fasi tardive, l'attivazione della TG2 catalizza la formazione di un involucro proteico nella cellula morente, la quale acquisisce caratteristiche peculiari di impermeabilità, evitando così il rilascio del contenuto cellulare potenzialmente dannoso per l'organismo. Sebbene questi risultati indichino che la TG2 gioca un ruolo chiave nell'apoptosi, non è stata ancora ben definito quale sia la sua posizione precisa nella cascata di eventi che conducono alla morte cellulare (Fesus L., Szondy Z. 2005).

In riferimento ai risultati presenti già in letteratura e comparandoli con i nostri risultati possiamo affermare che: la gliadina digerita induce un aumento della produzione di ROS in cellule Caco-2 con un'alterazione dello stato redox cellulare. Inoltre, l'alta concentrazione di ROS induce danno al DNA e la stimolazione del processo apoptotico. Questo meccanismo sembra presente anche in vivo, come dimostrano i risultati in pazienti celiaci.

Infatti, i nostri risultati hanno dimostrato un aumento della produzione di ROS indotta da peptidi gliadinici in cellule Caco-2. I livelli di ROS sono risultati più elevati alla massima concentrazione (1000µg/mL) e dopo 12h di trattamento, con una riduzione dopo 24h. Questo risultato può identificare l'attivazione di un evento ossidativo precoce e un successivo aumento del numero degli enzimi antiossidanti endogeni.

L'aumento dei livelli di ROS può portare danni alle biomolecole proprio per questo motivo abbiamo voluto valutare la presenza di danno al DNA indotto da gliadina. Infatti i nostri risultati confermano l'ipotesi di un processo genotossico. Attraverso il comet test alcalino abbiamo identificato un danno al doppio e al singolo filamento di DNA. Dopo 24h di esposizione con gliadina digerita alla massima concentrazione (1000µg/mL) si evidenzia un aumento significativo del % di DNA nella coda. Con questo tipo di test non è possibile discriminare se il danno indotto da gliadina è di tipo diretto oppure generato da alte concentrazioni di ROS. Per poter sottolineare di che tipo di danno si tratta abbiamo utilizzato una comet modificata utilizzando l'enzima Endonucleasi III, la quale è in grado

di riconoscere le basi pirimidiniche ossidate. I nostri risultati hanno portato alla conclusione che il danno genotossico indotto dalla gliadina è di tipo ossidativo caratterizzato da un aumento della lunghezza della coda.

Anche il test di immunofluorescenza, utilizzando il marcatore γ H2AX ha confermato la presenza di danno genotossico. L'aumento dei DSBs è stato riscontrato attraverso un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule con più di 10 foci sia alla concentrazione di 500 μ g/mL che 1000 μ g/mL. Il test γ -H2AX è particolarmente preciso per rilevare danni al doppio filamento di DNA (DSB) e permette la visualizzazione fluorescente e la localizzazione fisica dei DSB. Questo test è stato ritenuto rapido, semplice ed affidabile e recentemente, è stato stabilito che il γ -H2AX è 100 volte più sensibile nel rilevare livelli di danno rispetto al comet test.

La condizione di stress ossidativo intracellulare porta all'attivazione di differenti pathway come ad esempio all'aumento dell'espressione della Transglutaminasi 2. Infatti nel nostro studio i livelli di Transglutaminasi risultano significativamente aumentati dopo 24h di trattamento con gliadina alla massima concentrazione. La diversa localizzazione a livello cellulare di questo enzima porta a conseguenze diverse. Nei nostri esperimenti la Transglutaminasi 2 sembra essere espressa maggiormente nella cromatina e nel citoscheletro.

Questa precisa localizzazione potrebbe innescare un processo apoptotico come è stato dimostrato attraverso la valutazione con Annessina V.

Per rendere questo studio il più veritiero possibile e comparabile ad una situazione reale, alcuni test sono stati condotti anche *in vivo*.

L'analisi dello stress ossidativo è stata effettuata attraverso l'analisi di biomarcatori a livello del plasma in pazienti celiaci prima diagnosi, pazienti celiaci a dieta da 12 mesi e pazienti non responsivi alla dieta (RCD). Attraverso quest'analisi è stato possibile dimostrare come la capacità antiossidante nei pazienti celiaci è notevolmente ridotta rispetto a pazienti controllo. Le concentrazioni plasmatiche di TBARS e proteine carboniliche sono stati trovati significativamente aumentati nei pazienti RCD rispetto ai celiaci a dieta.

I nostri dati sono coerenti con quelli in letteratura, che mostrano uno squilibrio redox nei pazienti celiaci, con un significativo aumento della concentrazione plasmatica di PC e TBARS (Odetti P. 1998).

Per la prima volta, in questo studio, abbiamo descritto il profilo ossidativo dei pazienti celiaci refrattari. In pazienti RCD, nonostante la terapia (dieta senza glutine), lo squilibrio ossidativo è particolarmente evidente caratterizzato da un aumento dei livelli di PC, TBARS rispetto ai celiaci a dieta e una diminuzione significativa dei TAC. I nostri risultati confermano che la celiachia è associata a un danno ossidativo e con una significativa riduzione del TAC. La diminuzione della capacità antiossidante e un aumento dei prodotti della perossidazione lipidica potrebbero esercitare un effetto pro-infiammatorio e citotossico e potrebbero pertanto contribuire al danno cellulare gastrointestinale.

Inoltre i dati *in vitro* riguardante il danno genotossico sono stati confermati dai risultati preliminari ottenuti da biopsie di pazienti celiaci. *In vivo* si evidenzia, la presenza di 8-oxo-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG) in soggetti celiaci e l'aumento di H2AX, che diventa fosforilato sulla serina 139 come reazione di rotture del doppio filamento (DSB). Essi potrebbero essere marcatori per stimare il danno al DNA e l'inizio del processo di cancerogenico.

Questi risultati si aggiungono alle informazioni sulla proprietà biologiche della gliadina e l'interazione tra gliadina con gli enterociti. L'alterazione dell'equilibrio redox, l'aumento di ROS e l'apoptosi, e danno al DNA possono essere fattori molto importanti per comprendere al meglio la patogenesi di malattie correlate al glutine.

BIBLIOGRAFIA

- Arrigo A. P. „Gene expression and the thiol redox state.“ *Free Radic.Biol. Med.* , 1999: 27(9-10):936-44.
- Artrusson P., Palm K., Luthman K. „, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport.“ *Adv .Drug Deliv. Rev.*, 2001: 46: 27-43.
- Aw T.Y. „Determinants of intestinal detoxication of lipid hydroperoxides.“ *Free Radic. Res*, 1998: 128 (6):637-646.
- AW T.Y. „Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility.“ *Toxicol Appl Pharmacol* , 2005: 204: 320-328.
- Aw T.Y. „Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine.“ *Am J Clin Nutr*, 1999: 70 (4): 557-565.
- Aziz I., Lewis N.R., Hadjivassiliou M., Winfield S.N., Rugg N., Kelsall A., Newrick L., Sanders D.S. „A UK study assessing the population prevalence of self-reported gluten sensitivity and referral characteristics to secondary care.“ *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014: 26: 33–9.
- Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B., Rhee S.G.. „Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation.“ *J. Biol. Chem*, 1997: 272(1):217-21.
- Biesiekierski J.R., Peters S.L., Newnham E.D., Ourania R., Muir J.G., Gibson P.R. „, No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates.“ *Gastroenterology*, 2013: 145:320–328.
- Boda M., Nèmeth I., Boda D. „, The caffeine metabolic ratio as an index of xanthine oxidase activity in clinically active and silent celiac patients.“ *J Pediatr Gastroenterol Nutr* , 1999: 29: 546-550.

- Braga P.C. „I radicali ossidanti, le patologie polmonari: l'acido ascorbico.“ *Milano: Springer.*, 1997.
- Caccamo D., Curro M., Ferlazzo N., Condello S., Lentile R. „Monitoring of transglutaminase 2 under different oxidative stress conditions. “ *Amino Acids.* , 2012: 42:1037–43.
- Caputo I., D'Amato A., Troncone R., Auricchio S., Esposito C. „Transglutaminase 2 in celiac disease.“ *Amino Acids* , 2004.
- Catassi C., Cobellis G. „Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world.“ *Dig Liver Dis*, 2007: 39:908-910.
- Catassi C., Bai J.C., Bonaz B., Bouma G., Calabrò A., Carroccio A., Castillejo G., Ciacci C., Cristofori F., Dolinsek J., Francavilla R., Elli L., Green P., Holtmeier W., Koehler P., Koletzko S., Meinhold C., Sanders D., Schumann M., Schuppan D., Ullrich R., Vécsei A., Volta U., Zevallos V., Sapone A., Fasano A. „Non-celiac gluten sensitivity: The new frontier of gluten related disorders.“ *Nutrients*, 2013: 5:3839–3853.
- Catassi C., Gatti S., Lionetti E. „ World perspective and celiac disease epidemiology.“ *Dig Dis.*, 2015: 33:141–146.
- Cianferoni A. „Wheat allergy: diagnosis and management.“ *J Asthma Allergy*, 2016: 9: 13–25.
- Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Parroni R., Muzi P., D'Alo S., Ventura T., Pistoia M.A., Cifone M.G., Corazza G.R. „Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease.“ *Am. J. Clin. Pathol.* , 2001: 115:494-503.
- Clemente M.G., De Virgiliis S., Kang J.S., Macatagney R., Musu M.P., Di Pierro M.R., Drago S., Congia M., Fasano A. „Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function.“ *Gut*, 2003: 52(2):218-23.
- Collins A. „ The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations.“ *Mol Biotechnol*, 2004: 26: 249-261.

- Corti A., De Tata V, Pompella A. „Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana.“ (*Rassegna*) *Dipartimento di Patologia Sperimentale, Scuola Medica dell'Università, Pisa*, 2009: 14 (1):8-15.
- Dalle Donne I., Aldini G., Carini M., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Davies K.J.A. „Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. .“ *J. Biol. Chem*, 1987: 262: 9895-9901.
- Das Sarma A., Mallick A.R., Ghoshet A.K. „Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview.“ *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 2010: 1(3):185-192.
- Davies K. J. „Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 1987: 262(20):9895-901.
- de Lorgeril M., Salen P. „Gluten and wheat intolerance today: are modern wheat strains involved?“ *Int J Food Sci Nutr.*, 2014: 65(5):577-81.
- De Martin R., Hoeth M., Hofer-Warbinek R., Schmid JA., „The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function.“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 2000: 20: e83–e88.
- Dean R. T. „Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins.“ *Trends Biochem. Sci.*, 1993: 18(11):437-41.
- Dewar D.H., Ciclitira P.J. „ Clinical features and diagnosis of celiac disease.“ *Gastroenterology*, 2005. : 128: S19-24.
- Di Sabatino A., Corazza G.R. „Coeliac disease.“ *Lancet*, 2009: 373: 1480–93.
- Di Sabatino A., Ciccocioppo R., D'Alò S., Parroni R., Millimaggi M., Cifone M.G., Corazza G.R. „Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity coeliac disease.“ *Gut*, 2001: 49, 380–386.
- Dick J.W., Matsuo R.R. „ Durum wheat and pasta products. In: Pomeranz, Y., (ed.): Wheat: Chemistry and Technology.“ *Am. Ass. Cereal Chem*, 1988: 507-547.

- Dieterich, W. „A significant step in the celiac puzzle.“ *Gastroenterology*, 1998: 114(6):1339-1340.
- Di Giacomo D.V., Tennyson C.A., Green P.H., Demmer R.T. „Prevalence of glutenfree diet adherence among individuals without celiac disease in the USA: results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010.“ *Scand J Gastroenterol*, 2013: 48: 921–5.
- Dolfini E., Elli L., Dasdia T., Bufardecì B., Colleoni M.P., Costa B., Floriani I., Falini M.L., Guerrieri N., Forlani F., Bardella M.T. „In vitro cytotoxic effect of bread wheat gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line.“ *Toxicol In Vitro*, 2002: 16(4):331-7.
- Dolfini E., Elli L., Roncoroni L., Costa B., Colleoni M.P., Lorusso V., Ramponi S., Braidotti P., Ferrero S., Falini M.L., Bardella M.T. „Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model.“ *World J Gastroenterol.*, 2005: 11(38): 5973–5977.
- Elli L., Bergamini C.M., Bardella M.T., Schuppan D. „Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver.“ *Dig Liver Dis.* , 2009: 41:541–55.
- Elli L., Branchi F., Tomba C., Villalta D., Norsa L., Ferretti F., Roncoroni L., Bardella M.T. „Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity.“ *World J Gastroenterol*, 2015: 21(23): 7110-7119.
- Elli L., Branchi F., Tomba C., Villalta D., Norsa L., Ferretti F., Roncoroni L., Bardella M.T. „Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity.“ *World J Gastroenterol* , 2015: 21(23): 7110-7119.
- Elli L., Dolfini E., Bardella M.T. „Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures.“ *Toxicol. Lett.*, 2003: 46, 1–8.
- Eyries M., Collins T., Khachigian L.M. „Modulation of growth factor gene expression in vascular cells by oxidative stress.“ *Endothelium*, 2004: 11(2):133-9.

- Fasano A., Berti I., Gerarduzzi T. „Prevalence of CD in at-risk and non at-risk groups: a large, multicentre study.“ *Arch Intern Med.*, 2003: 163:286–292.
- Fasano A., Catassi C. „Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum.“ *Gastroenterology* , 2001: 120: 636-651 .
- Fasano A., Not T., Wang W., Uzzau S., Berti I., Tommasini A., Goldblum S.E. „Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease.“ *Lancet.*, 2000: 29;355(9214):1518-9.
- Fesus L., Szondy Z. „Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival.“ *FEBS Letters*, 2005: 3297–3302.
- Finkel T. „Oxidant signals and oxidative stress.“ *Current Opinion in Cell Biology*, 2003: 15(2):247-54.
- Finkel T. „Oxygen radicals and signaling.“ *Current Opinion in Cell Biology*, 1998: 10(2):248-53.
- Finkel T. „Redox-dependent signal transduction.“ *FEBS Lett*, 2000: 476(1-2):52-4.
- Fogh J., Trempe G. „Human Tumor Cells In Vitro.“ *Plenum*, 1975: 115-141.
- Fojta M., Kubicárová T., Vojtěšek B., Paleček E. „Effect of p53 protein redox states on binding to supercoiled and linear DNA.“ *J. Biol. Chem.*, 1999: 274(36):25749-55.
- Frankel E.N., Meyer A.S. „The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants.“ *J Sci Food Agric*, 2000: 80: 1925-1941 .
- Freeman H.J. „Malignancy in adult celiac disease.“ *World J Gastroenterol*, 2009: 15:1581–83.
- Friis S., Dabelsteen E., Sjøstrøm H., Noren O., Jarnum S. „Gliadin uptake in human enterocytes. Differences between coeliac patients in remission and control individuals.“ *Gut*, 1992: 33:1487–92.

- Galley H. F. „Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis.“ *British Journal of Anaesthesia*, 2011: 107 (1): 57–64.
- Gianfrani C., Auricchio S. Troncone R. „Adaptive and innate immune responses in celiac disease.“ *Immunol Lett*, 2005: 99(2): 141-5.
- Gilmore T.D. „The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction.“ *Oncogene*, 1999: 18(49):6842-4.
- Giovannini C., Matarrese P., Scazzocchio B., Vari R., D'Archivio M., Straface E., Masella R., Malorni W., De Vincenzi M. „Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas/Fas ligand pathway.“ *FEBS*, 2003: 117-124.
- Giovannini C., Sanchez M., Straface E., Scazzocchio B., Silano M., De Vincenzi M. „Induction of apoptosis in Caco-2 cells by wheat gliadin peptides.“ *Toxicology*, 2000: 145:63–71.
- Gotoh Y. Cooper J.A. „Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction.“ *J. Biol. Chem.*, 1998: 273(28):17477-82.
- Gotoh, Y., Nodam T., Iwakiri R., Fujimoto K., Rhoads C.A., Aw, T.Y. „Lipid peroxide-induced redox imbalance differentially mediates CaCo-2 cell proliferation growth arrest.“ *Cell Prolif.*, 2002: 35(4):221-235.
- Gres M.-C., Julian B., Bourrie M. V., Meunier C., Roques M., Berger B., Berger X. Y., Fabre G. „Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-/ cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line.“ *Pharm. Res.*, 1998: 726-733.
- Griffin M., Casadio R., Bergamini C.M. „Transglutaminases: nature's biological glues.“ *Biochem J.*, 2002: 368(2): 377-96.
- Grisham M.B. „Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease.“ *Lancet*, 1994: 344: 859–861.

- Halliwell B. „Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?“ *Lancet*, 1994: 344:721–724.
- Harman D. „The aging process.“ *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981: 78(11): 7124-7128.
- Hengartner M.O. „The biochemistry of apoptosis.“ *Nature*, 2000: 407(6805):770-6.
- Hermes-Lima M. „Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical.“ *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 2004: 319-368.
- Iatropoulos, M.J. „Morphology of the gastrointestinal tract, In: .“ *Gastrointestinal toxicology* , 1986: 246-266.
- Ientile R., Caccamo D., Griffin M. „Tissue transglutaminase and the stress response.“ *Amino Acids.*, 2007: 33:385–94.
- Imai H., Nakagawa Y. „Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells.“ *Free Radic. Biol Med.*, 2003: 34(2):145-169.
- Iorio E.L. „Radicali liberi e antiossidanti in medicina dello sport.“ 2007, Osservatorio internazionale dello stress ossidativo: (p. 3-53). Salerno.
- Iwamoto M., Koji T., Makiyama K., Kobayashi N., Nakane P.K. „Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis.“ *J Pathol.*, 1996: 180(2):152-9.
- Junker Y., Zeissig S., Kim S.J., Barisani D., Wieser H., Leffler D.A., Zevallos V., Libermann T.A., Dillon S., Freitag T.L., Kelly C.P., Schuppan D. „Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. .“ *J Exp Med* , 2012: 209:2395–2408.
- Kagnoff M.F. „Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease.“ *J Clin Invest*, 2007: 117(1): 41-9.
- Kakkar P., Singh B.K. „Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control.“ *Mol. Cell. Biochem.*, 2007: 305: 235-53.

- Klaunig J. E. Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E., Walborg E.F. Jr. „The Role of Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis.“ *Environmental Health Perspectives*, 1992: 106(Suppl 1): 289–295.
- Konarev V.G. „The nature and the origin of the wheat genome on the data of grain protein immunochemistry and electrophoresis.“ *Proc. 6th Wheat Genet. Symp. Kyoto, Japan*, 1983: 65-75.
- Koning F. „Adverse effects of wheat gluten.“ *Ann Nutr Metab* , 2015: 67(suppl 2):8–14.
- Koning F. „Celiac disease: caught between a rock and a hard place.“ *Gastroenterology*, 2005: 129(4):1294-301.
- Lawrence J. „Oxyradicals and DNA damage Carcinogenesis.“ *Carcinogenesis*, 2000: 21 (3):361-370.
- Lee S.R. , Kwon K.S., Kim S.R., Rhee S.G. „Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor.“ *J. Biol. Chem.*, 1998: 273(25):15366-72.
- Lionetti P. „The enteropathy of celiac disease.“ *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002: (suppl); 34: 18-21.
- Logan R.F.A. „ Malignancy in unrecognized celiac disease: a nail in the coffin for mass screening? .“ *Gut*, 2009: 58:618–19.
- Londei M., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Quarantino S., Maiuri L. „Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease.“ *Mol Immunol*, 2005: 42(8): 913-8.
- Luciani A., Villella V.R., Vasaturo A., Giardino I., Pettoello-Mantovani M., Guido S., Cexus O.N., Peake N., Londei M., Quarantino S., Maiuri L. „Lysosomal accumulation of gliadin p31–43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa.“ *Gut* , 2010: 59, 311–319.
- Madara J., Trier J. „Physiology of the gastrointestinal tract.“ *Raven Press*, 1986: 1209-1250.

- Marsh M.N. „Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue')“ *Gastroenterology*, 1992: 102:330–54.
- Melissa R., Snyder, Murray A.J. „Celiac disease: advances in diagnosis.“ *Expert review of clinical immunology*, 2016: 12(4) 449–463.
- Monteleone G., Pender S.L.F., Alstead E., Hauer A.C., Lionetti P., MacDonald T.T. „Role of interferon- α in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. “ *Gut*, 2001: 48:425-429.
- Moss S.F., Attia L., Scholes J.V., Walters J.R., Holt P.R. „Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease.“ *Gut* , 1996: 39(6):811-7.
- Mustalahti K., Catassi C., Reunanen A. „The prevalence of CD in Europe: results of a centralized, international mass screening project.“ *Ann Med.*, 2010: 42:587–595.
- Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. „Redox regulation of cellular activation.“ *Annu. Rev. Immunol.*, 1997: 15: 351-369.
- Nurminskaya M.V., Belkin A.M. „Cellular Functions of Tissue Transglutaminase.“ *Int Rev Cell Mol Biol.* , 2012: 294:1–97.
- Odetti P., Valentini S., Aragno I., Garibaldi S., Pronzato M.A., Rolandi E., Barreca T., „Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. “ *Free Radic Res.*, 1998: 29(1):17-24.
- Olive P.L. „Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis.“ *Exp Cell Res.*, 1992: 198(2):259-67.
- Orth R.A., Shellenberger J.A. „Origin, production and utilization of wheat. Wheat Chemistry and Technology.“ *American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota*, 1988: 1-14.
- Pickett J.P., Pendergrass R.E., Bradford W.D., Elchlepp, J.G. „Localization of xanthine oxidase in rat duodenum; fixation of sections instead of blocks.“ *Stain.Technol.* , 1970: 45(1):35-36.

- Pinkas D.M., Strop P., Brunger A.T., Khosla C. „Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation.“ *PLoS Biol.*, 2007: 5(12):e327.
- Powers S. K., Jackson M.J. „Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production.“ *Physiol Rev.*, 2008: 88(4): 1243–1276.
- Powis G., Gasdaska J.R., Baker A. „Redox signaling and the control of cell growth and death.“ *Adv. Pharmacol.*, 1997: 38: 329-359.
- Quirce S., Diaz-Perales A. „Diagnosis and Management of Grain-Induced Asthma.“ *Allergy Asthma Immunol Res*, 2013: 5(6): 348–356.
- Rahman I., MacNee W. „Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches.“ *Free Radic. Biol. Med.*, 2000: 28(9):1405-20.
- Rahman I., Adcock I.M. „Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD.“ *European respiratory journal*, 2006: 1:219-42.
- Rainwater R., Parks D., Anderson M.E., Tegtmeyer P., Mann K. „Role of cysteine residues in regulation of p53 function.“ *Mol. Cell. Biol*, 1995: 15(7): 3892–3903.
- Raki M., Schjetne K.W., Stamnaes J., Molberg O., Jahnsen F.L., Issekutz T.B., Bogen B., Sollid L.M. „Surface expression of transglutaminase 2 by dendritic cells and its potential role for uptake and presentation of gluten peptides to T cells.“ *Scand J Immunol*, 2007: 65:213-220.
- Rivabene R., Mancini E., De Vincenzi M. „In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease.“ *Biochim Biophys Acta* , 1999: 1453:152–60.
- Rogakou E.P. „DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139.“ *J Biol Chem*, 1998: 273 (10): 5859-5869.
- Rojas E. „Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.“ *Journal of Chromatography B Biomed Sci Appl*, 1999: 722(1-2):225-54.

- Rosekrans P.C., Meijer C.J, Polanco I., Mearin M.L., van der Wal A.M., Lindeman J. „Long-term morphological and immunohistochemical observations on biopsy specimens of small intestine from children with gluten-sensitive enteropathy.“ *J Clin Pathol*, 1981.: 34: 138-44.
- Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., Takeda K., Tobiume K., Sawada Y., Kawabata M., Miyazono K., Ichijo H. „Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1.“ *EMBO J.*, 1998: 17(9):2596-606.
- Salo D.C., Pacifici R.E., Lin S.W., Giulivi C., Davies K.J.A. „Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation.“ *J. Biol. Chem.*, 1990: 265: 11919-.
- Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stammati A., Zucco F. „The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics.“ *Cell Biol Toxicol*, 2005: 21 (1): 1–26.
- Sander G.R., Cummins A.G., Henshall T., Powell B.C. „Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins.“ *FEBS Lett*, 2005: 579:4851–5.
- Sapone A., Bai J.C., Ciacci C., Dolinsek J., Green P.H.R., Hadjivassiliou M. „Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification.“ *BMC Medicine*, 2012: 10:13.
- Sapone A., Lammers K.M., Casolaro V., Cammarota M., Giuliano M.T., De Rosa M., Stefanile R., Mazzarella G., Tolone C., Russo M.I., Esposito P., Ferraraccio F., Carteni M., Riegler G., de Magistris L., Fasano A. „Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity.“ *BMC Med*, 2011: 9: 23. .
- Sarnesto A., Linder N., Raivio K.O. „Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein.“ *Lab. Invest.* , 1996: 74 (1):48-56.

- Schraufstatter I., Hyslop P.A., Jackson J.H. and Cochrane C.G. „Oxidant-induced DNA damage of target cells.“ *J Clin Inves.*, 1988: 82: 1040-1050.
- Schulzke J.D., Bentzel C.J., Schulzke I., Riecken E.O., Fromm M. „Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. .“ *Pediatr Res* , 1998: 43: 435-441 .
- Schuppan D. „Current concepts of celiac disease pathogenesis.“ *Gastroenterology* , 2000: 119: 222-224.
- Shackelford R.E. Kaufmann W.K., Paules R.S. „Oxidative stress and cell cycle checkpoint function.“ *Free Radic. Biol. Med.*, 2000: 28(9):1387-404.
- Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. „, Role of Caco-2 cells monolayers in prediction of intestinal drug absorption.“ *Biotechnol.* , 2006: 186-198.
- Shewry P.R., Halford N.G., Belton P.S., Tatham A.S. „The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain.“ *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*28;357(1418):133-42., 2002: 357(1418):133-42.
- Shewry, P.R. „Plant storage proteins.“ *Biol. Rev.*, 1995: 70: 375-426.
- Shuo-Wang Qiao, Sollid L.M., Blumberg R.S. „Antigen presentation in celiac disease.“ *Current Opinion in Immunology*, 2009: 21:111-117 .
- Siegel M., Strnad P., Watts R.E., Choi K., Jabri B., Omary M.B., Khosla C. „, Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. .“ *PLoS ONE*, 2008: 3:e1861.
- Soares R.L.S. „Celiac disease or Gluten Related Disorders? Who would be the disease of the time?“ *Arq Gastroenterol*, 2015: 52(3):165-6.
- Sollid L.M., Lie B.A. „Celiac disease genetics: current concepts and practical applications .“ *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005: 843–851.
- Spiteller G. „Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products.“ *Free Radic. Biol. M*, 2006: 41: 362-387.

- Stahlberg M.R., Hietanen E. „Glutathione and glutathione-metabolizing enzymes in the erythrocytes of healthy children and in children with insulin-dependent diabetes mellitus, juvenile rheumatoid arthritis, coeliac disease and acute lymphoblastic leukaemia.“ *Scand J Clin Lab Invest*, 1991: 51: 125-130.
- Stahlberg M.R., Hietanen E., Maki M. „Mucosal biotransformation rates in the small intestine of children.“ *Gut* , 1988: 29: 1058-1063.
- Stamnaes J., Sollid L.M. „Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen.“ *Seminars in Immunology*, 2015: 343–352.
- Stepniak D., Koning F. „Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity.“ *Hum Immunol* , 2006: 67(6): p. 460-8.
- Stojiljkovic V., Pejic S., Kasapovic J., Gavrilovic L., Stojiljkovic S., Nikolic D., Pajovic S.B. „Glutathione redox cycle in small intestinal mucosa and peripheral blood of pediatric celiac disease patients.“ *An Acad Bras Cienc* , 2012: 84(1): 175-184.
- Sundaresan M. Yu Z.X., Ferrans V.J., Sulciner D.J., Gutkind J.S., Irani K., Goldschmidt-Clermont P.J., Finkel T. „Regulation of reactive oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1.“ *Biochem J*, 1996: 318: 379-382.
- Suzuki Y.J. Forman H.J., Sevanian A. „Oxidants as stimulators of signal transduction.“ *Free Radic. Biol. Med.*, 1997: 22(1-2):269-85.
- Tak P.P., Firestein G.S. „NF- κ B: a key role in inflammatory diseases.“ *The Journal of Clinical Investigation*, 2001: 107:7-11.
- Tanpowpong P., Ingham T.R., Lampshire P.K., Kirchberg F.F., Epton M.J., Crane J., Camargo C.A. Jr, New Zealand Asthma and Allergy Cohort Study Group et al. „Coeliac disease and gluten avoidance in New Zealand children.“ *Arch Dis Child*, 2012: 97: 12–6.
- Thomas K.E., Sapone A., Fasano A., Vogel S.N. „Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: Role of the innate immune response in celiac disease.“ *J. Immunol.* , 2006: 176: 2512–2521.

- Tovoli F., Masi C., Guidetti E., Negrini G., Paterini P., Bolondi L. „Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders.“ *World J Clin Cases*, 2015: 3(3): 275-284.
- Ushio-Fukai M. Zafari A.M., Fukui T., Ishizaka N., Griendling K.K. „p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells.“ *J. Biol. Chem.*, 1996: 271(38):23317-21.
- van Heel D.A., West J. „Recent advances in coeliac disease.“ *Gut*, 2006: 55(7): 1037-46.
- Vincentini O., Quaranta M.G., Viora M., Agostoni C., Silano M. „Docosahexaenoic acid modulates in vitro the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2. “ *Clin. Nutr.* , 2011: 30: 541–546.
- Volta U., Bardella M.T., Calabro' A., Troncone R., Corazza G.R., Study Group for Non-Celiac Gluten Sensitivity. „An Italian prospective multicenter survey on patients suspected of having non celiac gluten sensitivity.“ *BMC Med*, 2014: 12: 85.
- Volta U., Caio G., Tovoli F., De Giorgio R. „Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness.“ *Cell Mol Immunol*, 2013: 10: 383-392.
- Wang H. „Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader.“ *Free Radic Biol Med.*, 1999: 27(5-6):612-6.
- Wang T.G., Gotoh Y., Jennings M.H., Rhoads C.A., Aw T.Y. „Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance.“ *FASEB J.*, 2000: 14(11):1567-1576.
- Watson A.J. „Necrosis and apoptosis in the gastrointestinal tract.“ *Gut*, 1995: 37(2):165-7.
- Wijeratne S.S., Cuppett S.L. „Lipid hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. “ *J Agric Food Chem*, 2006: 54: 4476-4481.
- Wolff S.P., Garner A., Dean R.T. „Fragmentation of proteins by free radicals and its effects on their susceptibility to enzymatic hydrolysis.“ *Biochem. J.*, 1986: 234: 399-403.

- Wu H.H., Momand J. „Pyrrolidine dithiocarbamate prevents p53 activation and promotes p53 cysteine residue oxidation.“ *J. Biol. Chem*, 1998: 273(30):18898-905.
- Yeats T.H., Rose J.K.C. „The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs).“ *Protein Sci.*, 2008: 17(2): 191–198.
- Young I. S., Woodside J.V. „, Antioxidants in health and disease.“ *J Clin Pathol*, 2001: 54(3):176-86.
- Zheng M., Aslund F., Storz G. „,Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.“ *Science*, 1998: 279(5357):1718-21.
- Zimmer K.P., Fischer I., Mothes T., Weissen-Plenz G., Schmitz M., Wieser H., Büning J., Lerch M.M., Ciclitira P.C., Weber P. Naim HY. „Endocytotic segregation of gliadin peptide 31–49 in enterocytes.“ *Gut* , 2010: 59: 300–310.

VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA'

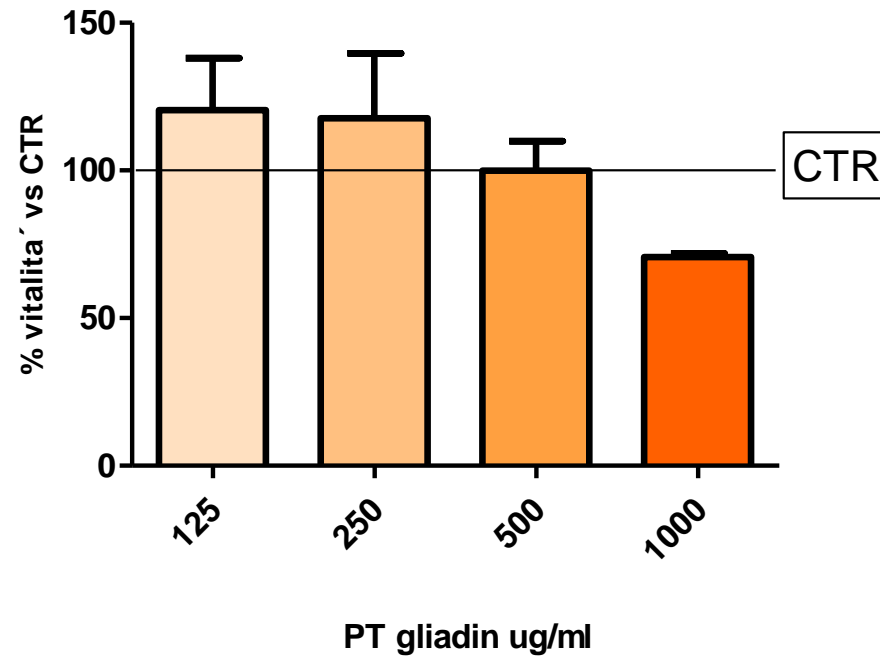
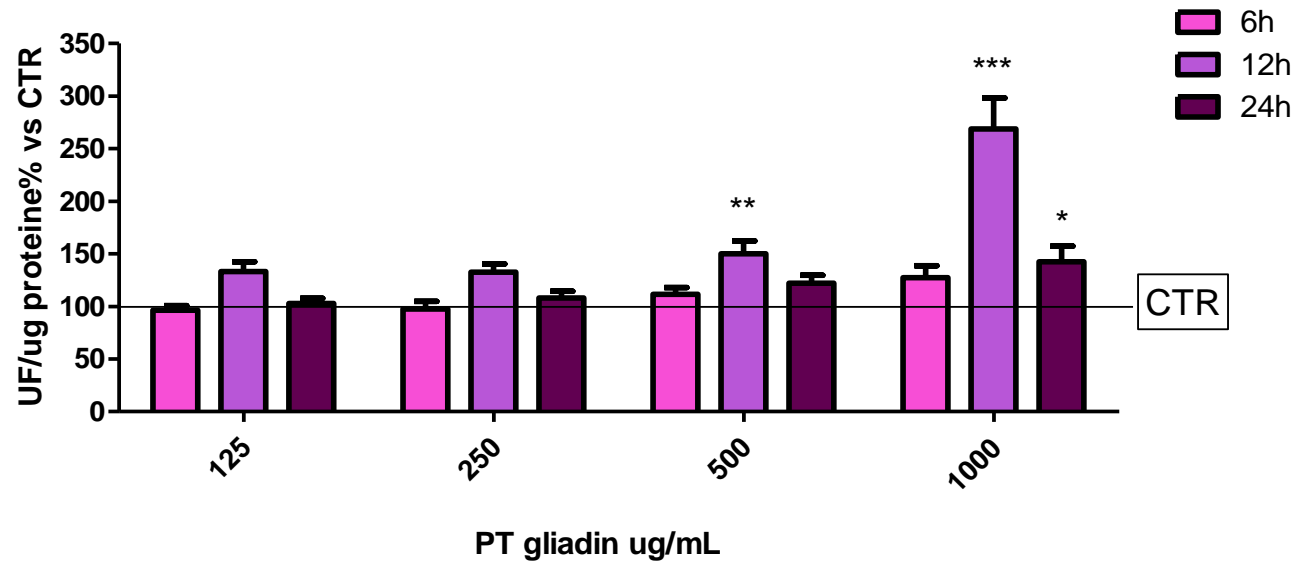


Figura 14 Valutazione della citossicità in cellule Caco-2 dopo il trattamento con gliadina digerita a differenti concentrazioni (125µg/mL-1000µg/mL) tramite il Test dell'MTT eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. La vitalità è espressa come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo negativo (CTR) a cui è attribuito il 100% di vitalità. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett).

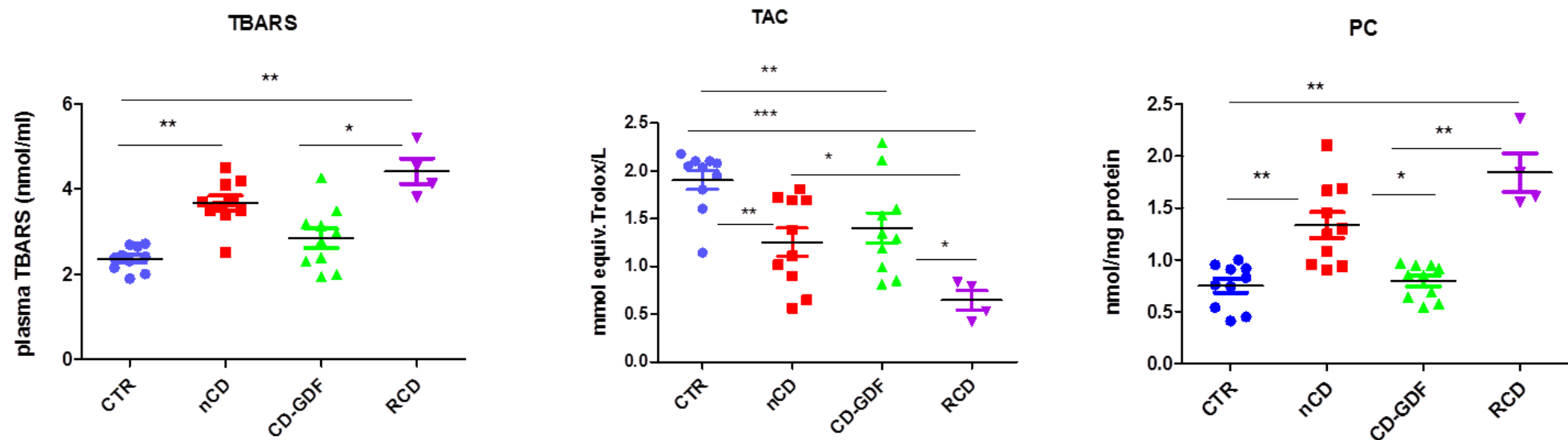
VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 15 Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno in cellule Caco-2 dopo il trattamento con gliadina digerita a differenti concentrazioni (125µg/mL-1000µg/mL) e a differenti tempi di esposizione (6h-12h-24h). La quantità intracellulare di ROS è stata valutata tramite l'utilizzo della sonda fluorescente DCFH-DA. I valori di fluorescenza sono stati normalizzati sul quantitativo proteico (U.F./mg proteine) ed espressi come percentuale rispetto ai valori del controllo negativo (CTR). I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnnett).

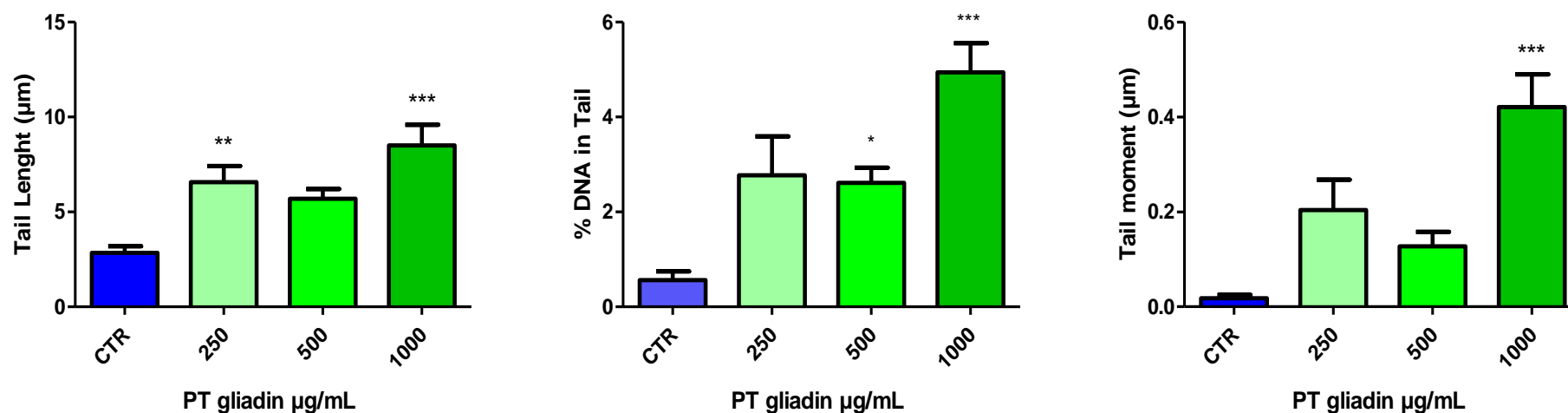
VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO IN PAZIENTI CELIACI



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 16 Valutazione dello stress ossidativo in pazienti celiaci. Sono stati valutati la perossidazione lipidica (TBARS), la capacità antiossidante totale (TAC) e le proteine carboniliche (PC). I risultati sono stati paragonati al controllo (CTR) e i dati sono stati analizzati con test statistico Two Way Anova (Bonferroni post hoc test).

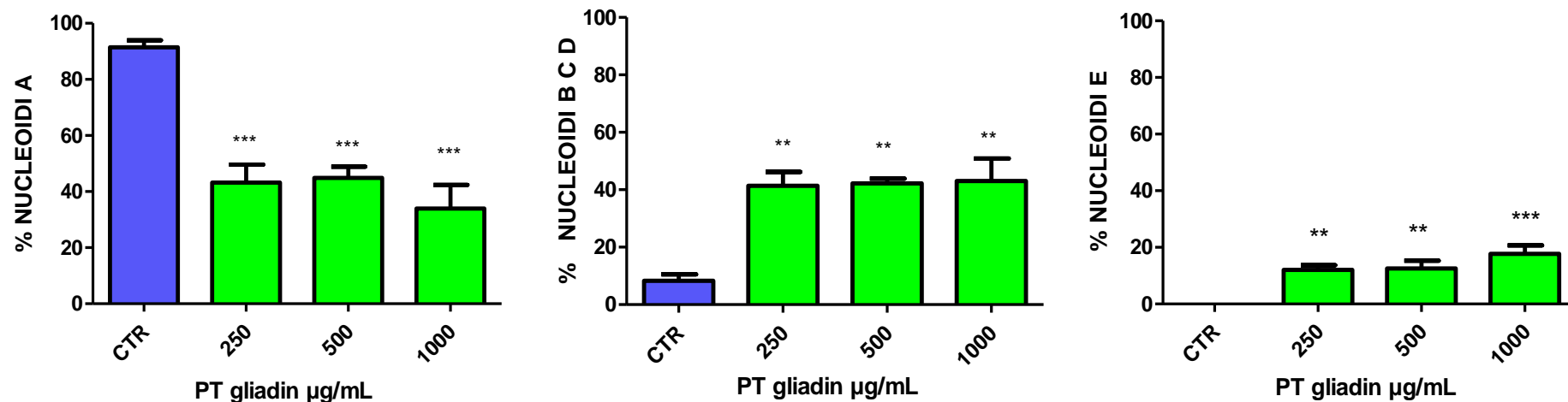
TEST DI GENOTOSSICITA' (COMET TEST ALCALINO)



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 17 Valutazione del danno genotossico in cellule Caco-2 dopo il trattamento con gliadina digerita a differenti concentrazioni (250µg/mL-1000µg/mL). Il danno genotossico è stato valutato tramite comet alcalino ($\text{pH} \geq 13$) eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. Il danno genotossico è stato quantificato tramite Tail Length, %DNA e Tail Moment. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett).

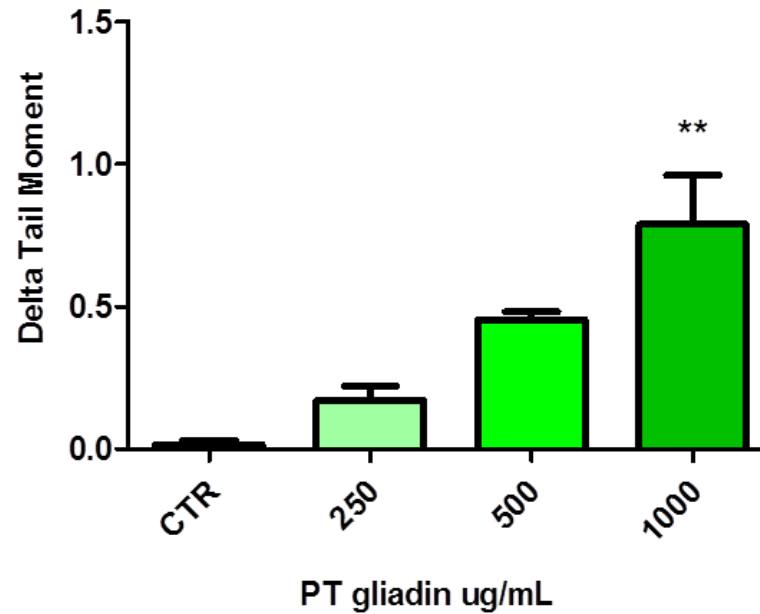
TEST DI GENOTOSSICITA' (COMET TEST ALCALINO)



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 18: Valutazione del danno genotossico in seguito a trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di digerito di gliadina. I parametri analizzati sono la percentuale di nucleoidi di tipo A, la percentuale di nucleoidi di tipo BCD e la percentuale di nucleoidi di tipo E. I dati sono stati elaborati tramite test statistico One-way Anova (Dunnett).

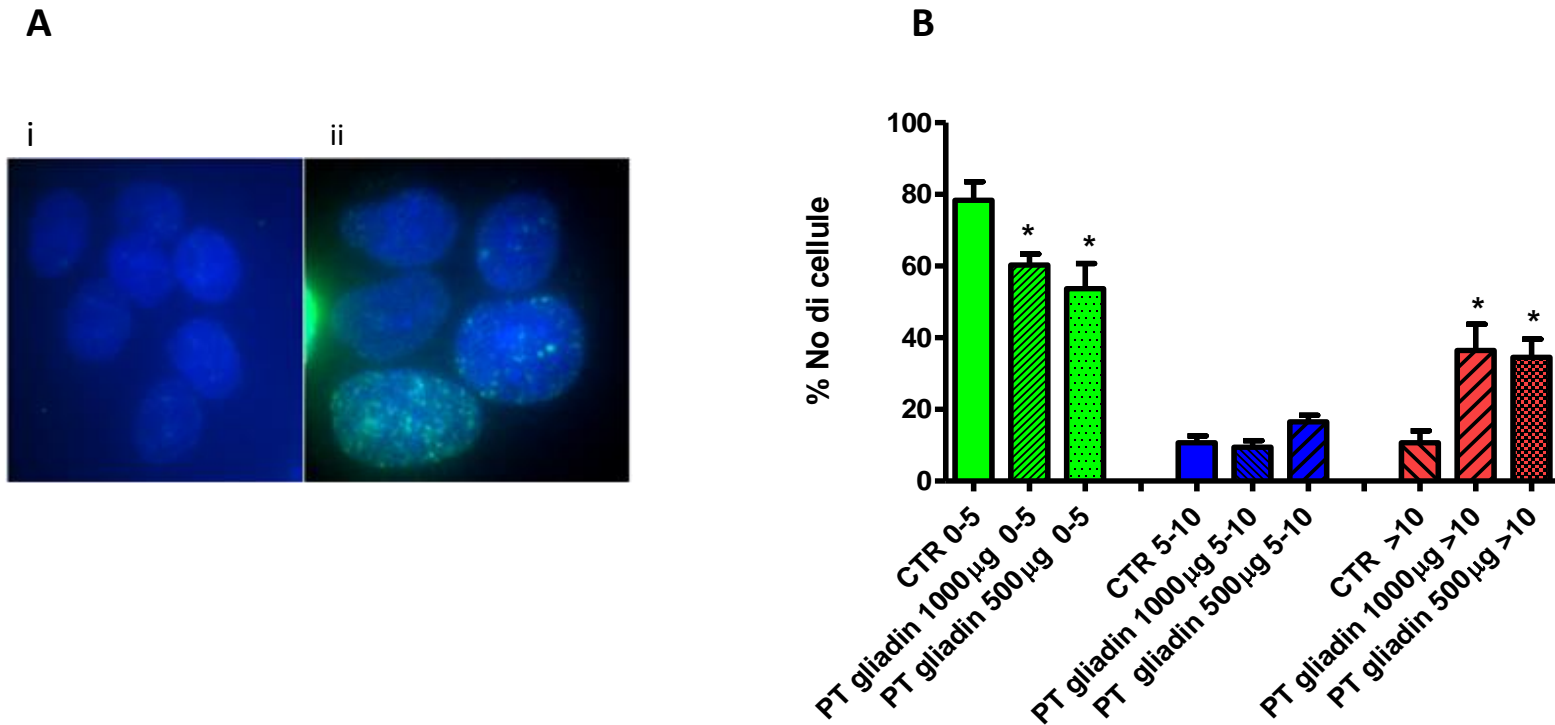
TEST DI GENOTOSSICITA' (COMET TEST CON ENDONUCLEASI III)



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 19 Valutazione del danno genotossico in cellule Caco-2 dopo il trattamento con gliadina digerita a differenti concentrazioni (250µg/mL-1000µg/mL). Il danno genotossico è stato valutato tramite comet alcalino modificato (pH=12) utilizzando enzima Endonucleasi III eseguito 24 ore dopo la fine del trattamento. Il danno al DNA è espresso come Δ tail moment rispetto al controllo. I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett).

TEST DELL'ISTONE γ H2AX



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 20 Pannello B: valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in cellule Caco-2. La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma fosforilata (γ H2AX). I dati sono espressi come percentuale di cellule appartenenti a ciascuna fascia di classificazione (a, b, c) e sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett). Pannello A(i) CTR e A(ii) 1000 PT gliadin 1000 μ g/mL.

ATTIVITA' DELLA TRANSGLUTAMINASI 2

ELISA TEST

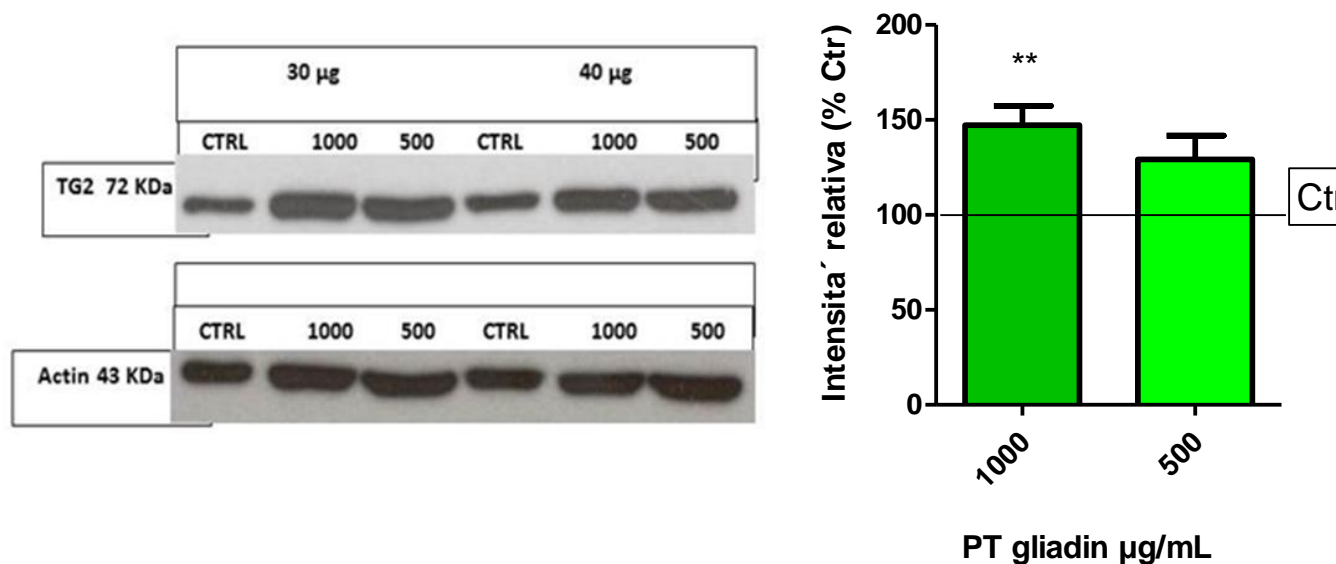
	CTR	1000µg/ml	500µg/ml	250µg/ml
MEMBRANA	15.75±2.60	18.60±6.54	17.75±4.92	9.00±1.00
CITOPLASMA	15.25±2.22	17.40±2.88	19.25±3.30	14.00±2.00
CITOSCHELETRO	17.25±6.70	28.00±5.43*	31.00±5.60**	47.33±5.51***
CROMATINA	15.00±1.63	19.00±2.65*	18.00±7.00	15.00±2.00
NUCLEO	15.30±3.65	19.00±4.53	20.33±4.73	15.00±4.00

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 21 Attività della Transglutaminasi 2 nei diversi compartimenti cellulari paragonata all'attività totale dello stesso campione, dopo trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di gliadina digerita (250µg/ml-1000µg/ml), nei diversi compartimenti cellulari a seguito di un frazionamento. I Risultati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett).

ATTIVITA' DELLA TRANSGLUTAMINASI 2

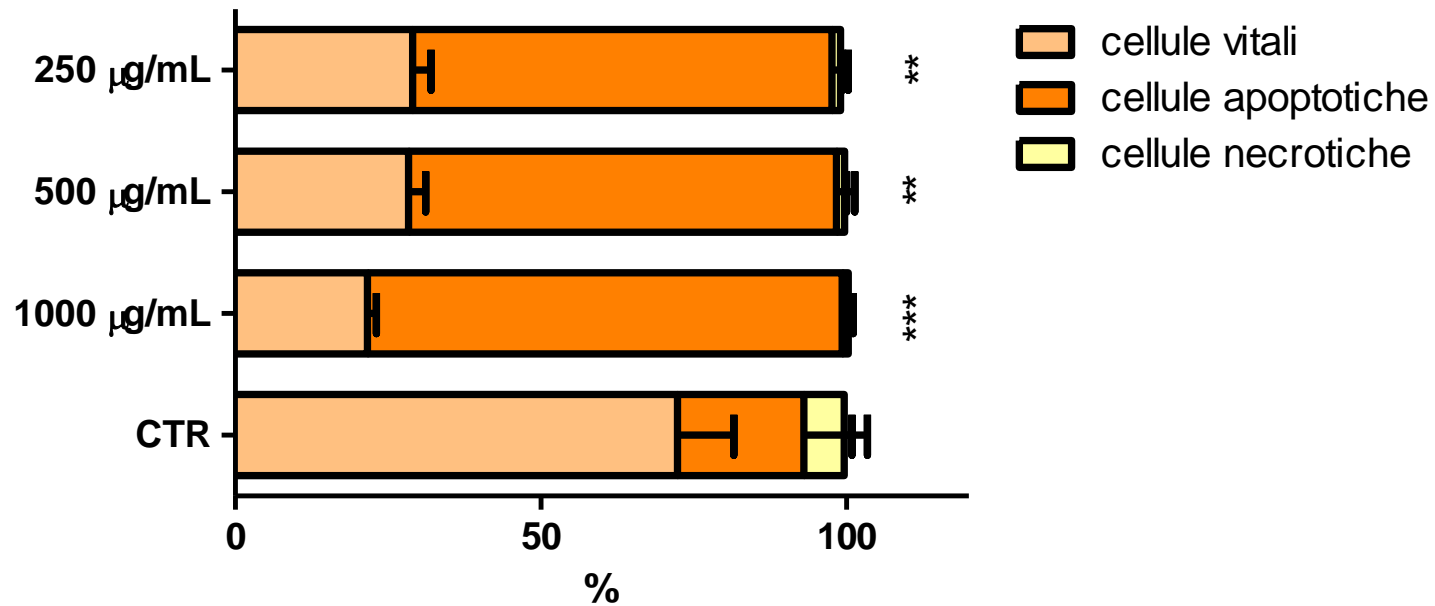
WESTERN BLOT



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 22 Valutazione dell'espressione della transglutaminasi mediante western blot dopo 24h trattamento con gliadina digerita a diverse concentrazioni (500µg/ml e 1000µg/ml). Le intensità delle bande sono stati quantificati mediante densitometria, normalizzati al livello di β actina che è stato utilizzato come controllo interno e calcolato come percentuale della risposta basale. Al controllo negativo è attribuito il valore di 100%, relativo alla produzione dell'enzima. I dati sono stati elaborati tramite test statistico One way Anova.

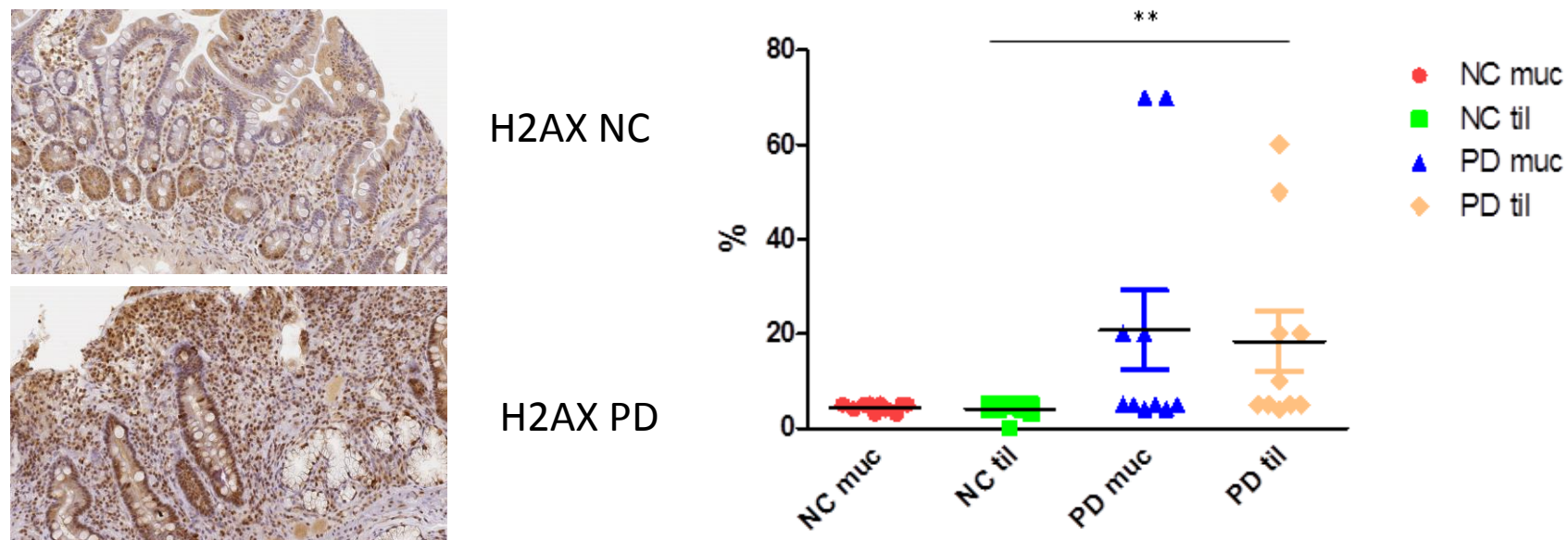
TEST APOPTOSI CON ANNESSINA V



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 23 Valutazione della percentuale di cellule apoptotiche in cellule Caco-2 dopo il trattamento a 24h con gliadina digerita a differenti concentrazioni (250µg/mL-1000µg/mL). I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett).

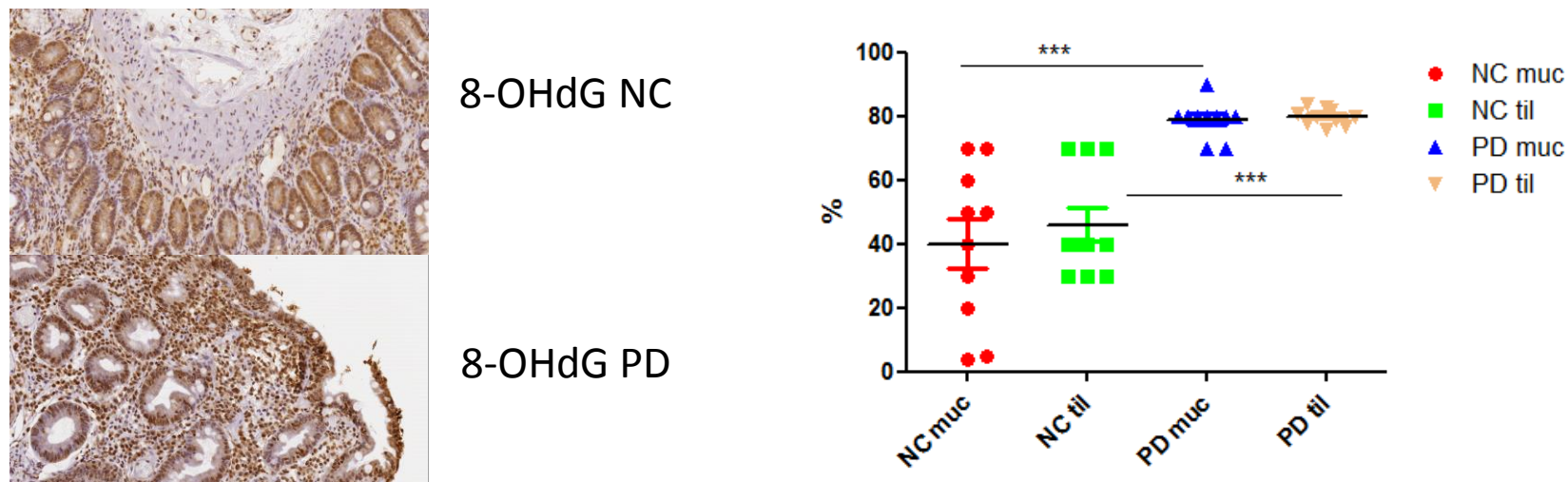
DANNO AL DNA IN BIOPSIE (γ H2AX)



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 24 Valutazione della presenza di danno al doppio filamento di DNA in biopsie di pazienti celiaci (PD) paragonata a pazienti sani (NC). La presenza di DSBs è stata rilevata attraverso immunomarcatura dell'istone H2AX nella sua forma (γ H2AX). La valutazione del danno è stata rilevata sia nella mucosa duodenale (muc) che in linfociti intraepiteliali (til). I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnett).

DANNO AL DNA IN BIOPSIE (8-OHdG)



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Figura 25 Valutazione della presenza di danno ossidativo al DNA in biopsie di pazienti celiaci (PD) attraverso l'immuniopositività del 8-OHdG paragonate a pazienti sani (NC). La valutazione del danno è stata rilevata sia nella mucosa duodenale (muc) che in linfociti intraepiteliali (til). I dati sono stati elaborati con test statistico One Way Anova (Dunnnett).

